

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Carolín Falten

Suitsetamise mõju inimese perifeerse vere leukotsüütidele

Magistritöö
Geenitehnoloogia
30 EAP

Juhendajad
MSc Berit Pilden-Sarv
MD, PhD Svetlana Sergejeva

TARTU 2016

INFOLEHT

Suitsetamise mõju inimese perifeerse vere leukotsüütidele

Suitsetamine ja sellest tingitud haigused on oluliseks suremuse põhjustajaks maailmas. Antud töö eesmärk oli hinnata suitsetamise mõju inimese vere leukotsüütidele, mis on oluline immuunsüsteemi osa. Katselises osas uuriti sigareti suitsu kondensaadi (CSC) ja e-sigareti vedelike mõju leukotsüütide elulemusele rakukultuurides. Sarnaselt varasemate uuringutega leiti, et suitsetamine põhjustab veres neutrofiilide arvu tõusu. Rakukultuuri tingimustes pärssis CSC eelkõige eosinofiilide elulemust – fenomen, mis ei olnud varasemalt teada. Uuringu märkimisväärsim tulemus oli e-sigareti vedelike mõju leukotsüütide elulemusele, mis avaldas negatiivset efekti eelkõige mittedsuitsetajate rakkudele. Saadud tulemused annavad aluse edasiste uuringute jaoks. Järgnevalt peaks uurima eelkõige eosinofiilide osalust suitsetamisest tingitud haiguste tekkemehhanismide hindamisel ning uurima täiendavalt e-sigareti vedelike pärssivat mõju leukotsüütidele.

Märksõnad: leukotsüüt, suitsetamine, sigareti suits, e-sigareti vedelik

CERCS kood: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

Smoking-Induced Changes in Human Peripheral Blood Leukocytes

Smoking and smoking-induced disorders are a major mortality cause in the world. The aim of the current study was to evaluate the effect of smoking on human peripheral blood leukocytes, which are an indispensable part of the immune system. In the experimental part of the work, the direct effect of cigarette smoke condensate (CSC) and electronic cigarettes' (e-cigarette) liquid on the survival of leukocytes was evaluated. In concordance with previous studies, our work shows that tobacco smoke induces an increase in the number of blood neutrophils. In cell culture experiments, CSC had primarily suppressed the viability of eosinophils, an effect which had not been reported earlier. The most substantial observation of this study is the inhibiting effect of the e-cigarette liquid on leukocyte survival, which was more pronounced particularly in non-smoking females. The obtained results can serve as a basis for future studies, which should address the role of eosinophil in smoking-induced disorders and evaluate possible negative effects of e-cigarettes on leukocytes.

Key words: leukocyte, smoking, cigarette smoke, e-cigarette liquid

CERCS code: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Immuunsüsteem.....	7
1.1.1 Leukotsüüdid	7
1.1.1.1 Granulotsüüdid	9
1.1.1.2 Agranulotsüüdid	10
1.1.2 Tsütokiinid.....	12
1.1.3 Põletik – keha kaitsereaktsioon	13
1.2 Suitsetamine.....	14
1.2.1 Suitsetamise levimus	14
1.2.2 Suitsetamise mõju organismile.....	16
1.2.3 Sigareti suits	18
1.2.4 E-sigaretid.....	19
2 EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1 Töö eesmärgid	20
2.2 Materjal ja meetoodika.....	21
2.2.1 Valim	21
2.2.2 Leukotsüütide eraldamine.....	22
2.2.3 Leukotsüütide külmutamine	23
2.2.4 Tsütospinnid	23
2.2.4.1 May-Grünwald – Giemsa värving	24
2.2.4.2 Leukotsüütide diferentsiaalloendus	24
2.2.5 Leukotsüütide rakukultuur.....	24
2.2.5.1 Leukotsüütide sulatamine	25
2.2.5.2 Tsentrifuugi programmi optimeerimine	25
2.2.5.3 CSC ja e-sigareti vedelike kontsentratsioonide optimeerimine.....	26
2.2.5.4 Leukotsüütide rakukultuur.....	26
2.2.6 Statistilised analüüsid	27
2.3 Tulemused	28
2.3.1 Suitsetamise epidemioloogia ECRHS uuringu andmete põhjal	28
2.3.2 ECRHS osalejate iseloomustus	29
2.3.3 ECRHS osalejate leukotsüütide diferentsiaalloendus.....	31
2.3.4 Rakukultuuri eksperimendid.....	34
2.3.4.1 Tsentrifuugi programmi optimeerimine	34

2.3.4.2 CSC ning e-sigareti vedelike kontsentratsioonide optimeerimine	35
2.3.4.3 CSC mõju leukotsüütide elulemusele.....	37
2.3.4.3.1 CSC mõju leukotsüütide alampopulatsioonidele.....	39
2.3.4.3.1.1 CSC mõju lümfotsüütidele	39
2.3.4.3.1.2 CSC mõju monotsüütidele.....	41
2.3.4.3.1.3 CSC mõju eosinofiilidele.....	42
2.3.4.4 E-sigareti vedelike mõju leukotsüütide elulemusele	43
2.3.4.4.1 E-sigareti vedelike mõju leukotsüütide alampopulatsioonidele	46
2.3.4.4.1.1 E-sigareti vedelike mõju lümfotsüütidele.....	46
2.3.4.4.1.2 E-sigareti vedelike mõju monotsüütidele	47
2.3.4.4.1.3 E-sigareti vedelike mõju eosinofiilidele.....	49
2.4 Arutelu	51
KOKKUVÕTE	57
SUMMARY.....	58
TÄNUSÕNAD	59
KASUTATUD KIRJANDUS.....	60
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	68
LISAD	69
LIHTLITSENTS.....	70

KASUTATUD LÜHENDID

CO – süsinikoksiid

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Dulbecco modifitseeritud *Eagle*'i sööde

DMSO – dimetüülsulfoksiid

ECRHS – *European Community Respiratory Health Survey*, Euroopa elanike hingamistervise uuring

e-sigaret – elektrooniline sigaret

FBS – *fetal bovine serum*, veise loote seerum

GM-CSF – *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, granulotsüütide-makrofaagide kolooniat stimuleeriv faktor

HSC - *hematopoietic stem cell*, hematopoeetiline tüvirakk

IL – interleukiin

MBP – *major basic protein*, suur baasvalk

PBS – *phosphate-buffered saline*, fosfaat-puhverdatud soolalahus

PGE₂ – prostaglandiin E₂

PMN – polümorfonukleaarsed rakud

p-a – pakk-aasta

TKU - Eesti täiskasvanud rahvastiku tervisekäitumise uuringud

TL – töölahus

TNF – *tumor necrosis factor*, tuumori nekroosi faktor

WBC – *white blood cells*, leukotsüüdid

WHO - *World Health Organization*, Maaailma Terviseorganisatsioon

SISSEJUHATUS

Immuunsüsteemi ülesandeks on organismi kaitse tagamine erinevate organismi siseste ning väliskeskkonnast pärinevate faktorite vastu. Immuunvastuse kujunemisel osalevad veres, lümfivedelikus ja kudedes asuvad leukotsüüdid, mille peamiseks ülesandeks on organismi kaitse tagamine fagotsütoosi ning antikehade moodustamise kaudu. Organismi esmaseks kaitsereaktsiooniks võõrvalkude vastu on põletiku tekitamine, mille indutseerimisel osalevad immuunrakud koos nende poolt sekreteeritud mediaatoritega.

Tänapäeva ühiskonnas on suitsetamine väga laialt levinud harjumus, millega kaasnevad haigused on muutunud üheks ulatuslikumaks surmade põhjustajaks maailmas. Järjepidev suitsetamine soodustab hingamisteede põletiku teket, mis võib aja jooksul kujuneda krooniliseks ning suurendada kopsu- ja veresoonkonnahaiguste tekke riski. Teadaolevalt kujunevad suitsetamisest tingitud kopsuhaigused välja ainult piiratud hulgal inimestel ning nende algupärased mehhanismid on tänaseks veel suuresti teadmata. Seetõttu on oluline uurida suitsetamise mõju organismile rakulisel tasandil.

Antud magistritöö keskendub suitsetamise mõju uurimisele inimeste verest eraldatud leukotsüütidele. Tulenevalt nende osalusest immuunvastuse kujunemisel ja põletiku indutseerimisel, on antud töö eesmärgiks analüüsida, kas suitsetamisest tingitud muutused saavad alguse just leukotsüütide tasemel. Töö katselises osas uuriti suitsetamise mõju nende elulemusele suitsetajate, endiste suitsetajate ning mittedsuitsetajate hulgas. Lisaks sigareti suitsule kaasati uuringusse ka viimastel aastatel ühiskonnas populaarseks muutunud elektroonilise sigareti (e-sigareti) vedelikud. E-sigarette propageeritakse kui ohutumalt alternatiivi ja võimalust suitsetamisharjumustest loobumiseks, samas ei ole piisavalt teaduslikku tõestust nende ohutuse kohta tervisele. Käesolevas töös kasutati Euroopa elanike hingamistervise uuringu (ECRHS, ingl *European Community Respiratory Health Survey*) raames kogutud patsientide vereproovidest eraldatud leukotüüte. Suitsetamise mõju uurimine vererakkude põhjal võib aidata leida seoseid, miks osadel inimestel arenevad välja suitsetamisest tingitud kopsuhaigused ning teistel mitte.

Käesolev magistritöö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi Siirdeimmunoloogia laboris.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

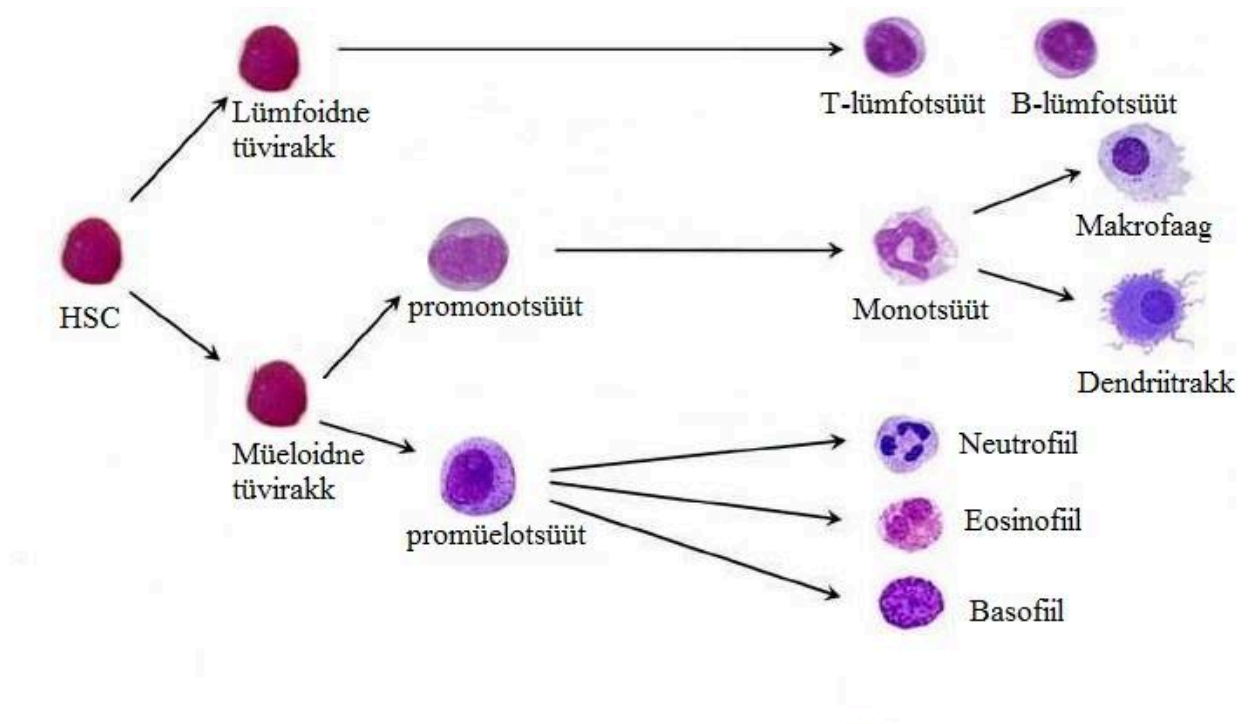
1.1 Immuunsüsteem

Immuunsüsteem on kogu organismi hõlmav võrgustik, mille eesmärk on keha kaitsmine nii keskkonnast pärinevate kui ka organismisiseste võõrvalkude eest. Igapäevaselt puutume kokku suure hulga erinevate antigeenidega, mis tuvastatakse immuunsüsteemi abil. Immuunsus jaguneb loomulikuks ja omandatud osaks, mis erinevad teineteisest immuunvastuse kujunemise kiiruse ja spetsiifilisuse poolest (Medzhitov ja Janeway, 2000; Parkin ja Cohen, 2001). Loomulik ehk kaasasündinud immuunsus on organismi esmane kaitse, mis tekib vahetult peale võõrvalkude tuvastamist. Loomulik immuunsus kutsub esile põletiku tekke koes, millele järgneb fagotsüütide ehk õgirakkude migreerumine kahjustunud piirkonda (Akira jt., 2006). Organismi täielikuks kaitseks ja varasema seisundi taastamiseks ei piisa üldjuhul loomulikust immuunsusest, mistõttu rakendub ka omandatud ehk adaptiivne immuunsus. Omandatud immuunvastust vahendavad B- ja T-lümfotsüüdid (Medzhitov ja Janeway, 2000). See on aja jooksul tekkiv spetsiifiline kaitsevastus, mille kujunemiseks võib kuluda mitmeid päevi (Parkin ja Cohen, 2001). Omandatud immuunsust iseloomustab ka immunoloogiline mälu, mis võimaldab organismil kiiremini reageerida sama antigeeni ilmnemisel järgnevatel kordadel (Crotty ja Ahmed, 2004).

1.1.1 Leukotsüüdid

Leukotsüüdid (WBC, ingl *white blood cells*) moodustavad osa immuunsüsteemist tsirkuleerides nii vereringes kui ka lümfivedelikus või paiknedes kudedes. Sarnaselt kõikidele vererakkudele on ka leukotsüütidele omane piiratud eluiga (Tavian jt., 2010), mistõttu toimub pidev vanade rakkude asendamine uutega vereloome ehk hematopoeesi käigus. Vereloome on protsess, mille käigus toodetakse kõiki vererakke elu jooksul pidevalt juurde luuüdis paiknevatest pluripotentsetest hematopoeetilistest tüvirakkudest (HSC, ingl *hematopoietic stem cell*) (joonis 2) (Tavian jt., 2010; Sarvothaman jt., 2015). Hematopoeetiline tüvirakk on ühelt poolt võimeline lõputult uuenema ja jätkama tüviraku populatsiooni ning teisalt diferentseeruma ka kõikideks perifeerse vere rakutüüpideks (Krause, 2002; Tavian jt., 2010; Warr jt., 2011). Igapäevaselt varustab luuüdi vereringet ligikaudu triljoni uue vererakuga (Doulatov jt., 2012), mis teeb verest äärmiselt kõrge regeneratsioonivõimega koe.

Leukotsüüdid on tuumaga rakud, mis osalevad immuunvastuse kujunemisel, et kaitsta organismi võõrvalkude eest. Küpsed leukotsüüdid arenevad müeloidsetest ja lümfoidsetest tüvirakkudest (joonis 1), mis diferentseeruvad erineva fenotüübi ja funktsioonidega rakutüüpideks (Hashimoto jt., 2003). Müeloidsetest tüvirakkudest diferentseeruvad monotsüütide, neutrofiilide, eosinofiilide ja basofiilide rakuliinid ning lümfoidsetest B- ja T- lümfotsüütide rakuliinid (Sarvothaman jt., 2015).



Joonis 1. Vereloome skeem. HSC võib luuüdis diferentseeruda nii lümfoidseks kui ka müeloidseks tüvirakuks. Lümfoidsest tüvirakust saavad alguse B- ja T-lümfotsüütide rakuliinid, müeloidsest arenevad neutrofiilid, eosinofiilid, basofiilid ja monotsüüdid. Veres ringlevatest monotsüütidest arenevad omakorda kudedes paiknevad makrofaagid ja dendriitrakud. Muudetud (Sarvothaman jt., 2015).

Leukotsüüte grupeeritakse ka nende tsütoplasmas paiknevate spetsiifiliste graanulite olemasolu alusel, sellest lähtuvalt jagatakse neid granulotsüütideks ja graanuleid mittesisaldavateks agranulotsüütideks. Agranulotsüüdid on perifeerse vere mononukleaarsed rakud, mille hulka kuuluvad monotsüüdid ning B- ja T-lümfotsüüdid. Granulotsüütide alagrupi moodustavad neutrofiilid, eosinofiilid ja basofiilid, mida eristatakse vastavalt graanulite värvusele.

1.1.1.1 Granulotsüüdid

Granulotsüütidest on kõige suurema populatsiooniga fagotsütoosivõimelised neutrofiilid, moodustades leukotsüütide koguhulgast ligi 70%. Neutrofiilide ehk polümorfonukleaarsete (PMN, ingl *polymorphonuclear*) leukotsüütide nimetus tuleneb nende mitmesagaralisest tuumast. Neutrofiilide tsütoplasmas paiknevad spetsiifilised graanulid, mis sisaldavad mitmeid patogeenide elimineerimiseks vajalikke antimikroobseid ning tsütotoksilisi aineid (Faurschou ja Borregaard, 2003). Neile on iseloomulik lühike eluiga, keskmiselt 1,5 – 8 h (Galli jt., 2011), samas on näidatud, et neutrofiilid võivad veres ringleda ka kuni 5,4 päeva (Pillay jt., 2010). Neutrofiilid on marginaalse tähtsusega immuunvastuse kujunemisel (Brinkmann jt., 2004; Ley jt., 2007; Sadik jt., 2011; Phillipson ja Kubes, 2011; Mantovani jt., 2011; Amulic jt., 2012), liikudes põletikukoldesse esimeste leukotsüütidena (Kolaczowska ja Kubes, 2013). Vastusena põletikule suureneb neutrofiilide hulk ja liikumine põletikukoldesse vaid minutite jooksul peale infektsiooni (Faurschou ja Borregaard, 2003). Ekstrasatsiooniks ehk veresoonte seina läbimiseks on vajalik rakkude aktivatsioon, mille tulemusel seonduvad neutrofiilid endoteeli rakkudega adhesioonimolekulide abil ning nõnda migreeruvad põletiku piirkonda (Galli jt., 2011). Varasemalt on kirjeldatud, et suitsetamise tagajärjel kahjustub neutrofiilide fagotsütoosivõime (Mehta jt., 2008), mistõttu väheneb ka organismi üldine vastupanuvõime nakkustele.

Lisaks neutrofiilidele kuuluvad granulotsüütide hulka ka eosinofiilid. Nad väljuvad luuüdist vereringesse küpsete rakkudena, moodustades leukotsüütide koguhulgast vähem kui 5%, kuid nende osakaal tõuseb oluliselt allergiliste haiguste korral (Fulkerson ja Rothenberg, 2013). Eosinofiilide diferentseerumist luuüdis suunavad tsütokiinid, mille hulka kuuluvad peamiselt interleukiinid IL-3, IL-5 ning GM-CSF (granulotsüütide-makrofaagide kolooniat stimuleeriv faktor, ingl *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Stone jt., 2010). Nad osalevad nii loomuliku kui ka omandatud immuunvastuse kujunemisel, osaledes T-lümfotsüütide aktiivsuse modifitseerimisel (Jacobsen jt., 2012) ning sekreteerides ka mitmeid põletikuga seotud mediaatoreid (Stone jt., 2010). Eosinofiilide poolt toodetavate põletikuliste mediaatorite hulka kuuluvad mitmed tsütokiinid, sealhulgas IL-6, IL-8, IL-1 β ja TNF- α (tuumori nekroosi faktor α , ingl *tumor necrosis factor α*) (Jacobsen jt., 2012). Sarnaselt neutrofiilidele toimub põletiku korral ka eosinofiilide ekstrasatsioon kahjustunud piirkonda. Esmalt peavad rakud seonduma adhesioonimolekulide kaudu endoteeli rakkudega ning migreeruma nende vahelt põletikukoldesse (Gleich, 2000). Erinevalt neutrofiilidest ei ole eosinofiilidel fagotsütoosi-

võimet, kuid neis paiknevad spetsiifilised graanulid sisaldavad mitmeid valke, mis mõjuvad infektsioonitekitajatele toksiliselt (Parkin ja Cohen, 2010; Acharya ja Ackerman, 2014). Graanulid sisaldavad suurt baasvalku (MBP, *major basic protein*), eosinofiilide katioonset valku (*eosinophil cationic protein*), peroksüdaasi ning neurotoksiini (Hogan jt., 2008). Teadaolevalt on MBP ja eosinofiilide peroksüdaas toksilise toimega mitmetele rakutüüpidele (Gleich jt., 1979; Tai jt., 1982), mille tulemusel võivad tekkida nii koekahjustused kui ka häired organite funktsioneerimisel (Fulkerson ja Rothenberg, 2013). Seevastu graanulites sisalduvad neurotoksiin ning katioonne valk on seotud viiruspartiklite elimineerimisega organismist (Domachowske jt., 1998). Lisaks väljutavad eosinofiilid ümbritsevasse keskkonda eikosanoide, leukotrieene ja rakk-rakk signaalmolekule, mistõttu on nad olulised ka erinevatest haigustest paranemise protsessides (Jacobsen jt., 2012). Suitsetamise mõjul suureneb eosinofiilide poolt põletikuga seotud tsütokiinide tootmine (Conçalves jt., 2011).

Granulotsüütidest kõige vähem ringleb veres basofiile, moodustades perifeerse vere leukotsüütidest alla 1% (Falcone jt., 2000). Sarnaselt kõigile teistele vererakkudele arenvad nad hematopoeetilistest tüvirakkudest ning väljuvad luuüdist vereringesse küpsete rakkudena. Basofiilide küpsemiseks on vajalik IL-3, mis suunab nende diferentseerumist (Stone jt., 2010). Basofiilid on 5 – 8 µm diameetriga rakud, nende graanulites sisaldub peamiselt histamiin, mis vabastatakse peale rakkude aktivatsiooni (Stone jt., 2010). Neile on omane lühike eluiga, ringledes veres kaks kuni kolm päeva (Schwartz jt., 2016). Lisaks on teada, et basofiilid on olulise tähtsusega loomuliku immuunsuse tagamises, osaledes mitmete patogeenide elimineerimisel organismist (Falcone jt., 2000). Basofiilid sekreteerivad rakulise immuunvastuse kujunemiseks olulisi tsütokiine ning ekspresseerivad suurel hulgal erinevaid tsütokiinide retseptoreid (Stone jt., 2010). Lisaks eosinofiilidele suureneb ka basofiilide osakaal ja aktiivsus põletikuliste protsesside korral (Wedemeyer jt., 2000).

1.1.1.2 Agranulotsüüdid

Agranulotsüüdid on perifeerse vere mononukleaarsed rakud, mille hulka kuuluvad monotsüüdid ja lümfotsüüdid. Erinevalt granulotsüütidest ei sisalda nende tsütoplasma spetsiifilisi graanuleid. Monotsüüdid pärinevad müelotsüütsest eellasrakust, moodustades leukotsüütide koguhulgast 5 – 10%. Võrreldes neutrofiilidega on monotsüütidel märgatavalt pikem eluiga, mistõttu toimub

nende migreerumine põletiku piirkonda oluliselt aeglasemalt, kuid see-eest pikema ajaperioodi vältel (Dale jt., 2008). Monotsüüdid on heterogeenne rakkude grupp, mida klassifitseeritakse vastavalt nende pinnal paiknevatele CD14 ja CD16 molekulide ekspressioonile. Selle alusel eristuvad klassikalised ($CD14^{++}CD16^{-}$), vahepealsed ($CD14^{++}CD16^{+}$) ning mitteklassikalised ($CD14^{+}CD16^{++}$) rakutüübid (Ziegler-Heitbrock, 2010), kus ++, + ja – tähistavad vastavalt kõrget, madalat ning puudulikku ekspressiooni. Klassikalised monotsüüdid moodustavad 85%, vahepealsed 5% ja mitteklassikalised 10% monotsüütide koguhulgast (Schauer jt., 2014). Klassikalised monotsüüdid tuvastavad ja elimineerivad patogeene (Yang jt., 2014), sekreteerivad erinevaid põletikuga seotud tsütokiine ning osalevad põletikumehhanismide (Yasaka jt., 1981) ja omandatud immuunvastuse käivitamisel (Ingersoll jt., 2011). Seevastu mitteklassikalised monotsüüdid ringlevad veres vaikimisi ja migreeruvad peamiselt põrna, kopsudesse ja maksa (Geissmann jt., 2003), kuid reageerivad kiiresti ka viiruspartiklite ilmumise korral (Ancuta jt., 2003; Cros jt., 2010). Väikseima populatsiooniga vahepealsed monotsüüdid osalevad antigeenide presenteerimisel (Zawada jt., 2011). Peale küpsemist tsirkuleerivad monotsüüdid veres mõne päeva ning migreeruvad seejärel kudedesse diferentseerudes uuteks rakutüüpideks. Monotsüüdid annavad aluse kudedes resideeruvatele makrofaagidele ja dendriitrakkudele (Yang jt., 2014; Sarvothaman jt., 2015). Sarnaselt teistele leukotsüütidele toimub põletiku korral ka monotsüütide ekstravasatsioon läbi endoteeli seina. Migratsioon võib toimuda mitme päeva jooksul sõltuvalt põletiku seisundist, kuid algset ekstravasatsiooni kutsuvad esile põletikukoldesse esimesena liikunud neutrofiilid (Ingersoll jt., 2011). Varasemalt on näidatud, et suitsetamine soodustab monotsüütide adhesiooni endoteeli rakkudega (Adams jt., 1997), mis omakorda võimaldab nende migreerumist põletiku piirkonda. Lisaks on inimese primaarsete monotsüütide puhul näidatud, et sigareti suits põhjustab rakkude aktivatsiooni ja seeläbi ka põletikutsütokiini IL-8 vabastamist (Walters jt., 2005).

Erinevalt eelnevatest WBC alatüüpidest on lümfotsüüdid immuunsüsteemi rakud, mis diferentseeruvad lümfoïdsest eellasrakust. Nende hulka kuuluvad B- ja T-lümfotsüüdid ning loomulikud tapjarakud. Sarnaselt kõigile teistele vererakkudele saavad nad samuti alguse luuüdis paiknevatest hematopoeetilistest tüvirakkudest (Sarvothaman jt., 2015). B-lümfotsüüdid liiguvad peale luuüdist väljumist põrna, kus toimub nende lõplik küpsemine (Hardy, 2006), samas kui T-lümfotsüüdid väljuvad luuüdist juba küpsete rakkudena (Boyman jt., 2009). B-lümfotsüüdid on olulised omandatud immuunvastuse kujunemisel, nad osalevad nii spetsiifilise kui ka organismi pikaaegse kaitse tagamises patogeene vastu (Hardwood ja Batista, 2009). Nende aktivatsiooni

põhjustab antigeenide äratundmine pinnal asuvate retseptorite kaudu, mille tulemusel nad võivad diferentseeruda nii antikehasid tootvateks plasmarakkudeks kui ka immunoloogilist mälu omavateks rakkudeks (Hardwood ja Batista, 2009). Lümfotsüüdid osalevad immuunvastuse kujunemisel tootes nii rakulise kui ka humoraalse immuunvastuse jaoks olulisi tsütokiine (Koyasu ja Moro, 2012). Varasemalt on näidatud, et suitsetamine põhjustab T-lümfotsüütide osakaalu tõusu (Schaberg jt., 1997; Saetta jt., 1998; Ekberg-Jansson jt., 2000) ning põletikuga seotud tsütokiinide tootmise vähenemist (Glader jt., 2006).

1.1.2 Tsütokiinid

Tsütokiinid on väikesed madalamolekulaarsed valgud, mis osalevad rakkudevahelises kommunikatsioonis. Neil on oluline roll organismi põletikust tingitud kaitsemehhanismide algatamisel ja reguleerimisel. Vastavalt nende funktsioonile jagatakse tsütokiinid põletiku- ehk proinflammatoorseteks tsütokiinideks ja põletikuvastasteks ehk anti-inflammatoorseteks tsütokiinideks. Põletikutsütokiinide ülesanne on organismi põletiku võimendamine (Zhang ja An, 2007) ning paranemisprotsessis osalevate leukotsüütide piirkonda migreerumise suunamine. Seda tüüpi tsütokiine vabastatakse kaskaadina põletiku korral (Jaffer jt., 2010), millest levinumad on IL-1 β , IL-8 ja TNF- α (tuumori nekroosi faktor, ingl *tumor necrosis factor*) (Zhang ja An, 2007; Jaffer jt., 2010). Paralleelselt põletikutsütokiinidega produtseeritakse ka põletikuvastaseid tsütokiine, mis on olulised liigse põletiku tekke vältimiseks ja põletiku taandamiseks organismis (Jaffer jt., 2010). Põhilised põletikuvastased tsütokiinid on IL-4, IL-10, IL-11 ja IL-13, nad on organismi immuunregulaatorid, mis kontrollivad põletikutsütokiinide vastust (Zhang ja An, 2007). Seevastu IL-6 võib käituda nii põletikutsütokiinina kui ka põletikuvastase tsütokiinina (Scheller jt., 2011).

Tsütokiinide rühma klassifitseeruvad ka kemokiinid ehk kemoatraktantsed tsütokiinid, mille hulka kuulub üle 50 väikese valgu. Immuunrakud sekreteerivad kemokiine vastusena põletikutsütokiinidele (Deshmane jt., 2009), mistõttu on nad olulise tähtsusega immuunsüsteemi kaitsvastuse kujunemisel. Kemokiinid osalevad põletiku reguleerimisel (Olson ja Ley, 2002) ning leukotsüütide migreerumise suunamisel põletiku piirkonda (Fernandez ja Lolis, 2002). Nad indutseerivad rakkude migratsiooni ja aktivatsiooni seondudes märklaudrakul olevatele kemokiini retseptoritele (Olson ja Ley, 2002).

1.1.3 Põletik – keha kaitsereaktsioon

Loomulik immuunsus kutsub esile põletiku indutseerimise kahjustunud koes (Akira jt., 2006), mida võimendab tsütokiinide ning kemoatraktantide tootmine protsessis osalevate rakkude poolt. Sellist immuunsüsteemi kaitsevastust võivad põhjustada keemilised ärritajad, toksiinid, vigastused ja infektsioonid (Schwartz jt., 2015), aga ka pikaaegne suitsetamine (Conçalves jt., 2011). Põletiku põhilisi tunnuseid - paistetust, punetust, temperatuuri tõusu, valulikkust ning põletikulise koe või elundi talitluse häireid - kirjeldas Celsius juba 2000 aastat tagasi (Muller, 2002; Nathan, 2002). Põletiku puhul eristatakse kroonilist ja akuutset vormi (Murakami ja Hirano, 2012). Kroonilise põletikuga seonduvad raskemini ravitavad haigused (Maskrey jt., 2011). Krooniline põletik on pikaaegne protsess, mida iseloomustab peamiselt mononukleaarsete rakkude ning nende poolt sekreteeritavate tsütokiinide vahendatud immuunvastus (Ryan ja Majno, 1977). Seevastu akuutset põletikku põhjustavad trauma või infektsiooni tagajärjel tekkinud koekahjustused. Akuutsest põletikust tingitud infektsioonist paranemiseks on olulised eelkõige fagotsüüdid ning nende poolt sekreteeritud tsütokiinid (Ryan ja Majno, 1977). Varasemalt on näidatud, et suitsuosakeste kokkupuude hingamisteede rakkudega kutsub esile akuutse põletiku teket (van der Vaart jt., 2004) ning järjepidev suitsetamine soodustab kroonilist põletikku (Lee jt., 2012).

Keha kaitsereaktsioonina avalduvale põletikule kiire vastuse saavutamiseks on oluline juba varasem immuunrakkude olemasolu kahjustunud koes. Kudedes resideeruvad paigsed immuunrakud vabastavad histamiini, eikosanoide, trüptaasi, tsütokiine ning proteaase (Nathan, 2002). Selle tulemusel toimub veresoonte laienemine, mis kutsub esile põletikule iseloomulikku punetust ja temperatuuri tõusu ning vedelike ekstravasatsiooni, mis soodutab omakorda paistetuse teket (Nathan, 2002). Sellistes tingimustes suureneb leukotsüütide hulk veres ning toimub nende suunatud liikumine põletikulise koe lähedusse ja migreerumine läbi endoteeli kapillaarseina (Ryan, ja Majno, 1977). Leukotsüütide migreerumiseks põletiku piirkonda on vajalik nende seondumine endoteeli rakkudega adhesioonimolekulide kaudu ning kemokiini kontsentratsiooni gradient, mille suunas nad liiguvad (Ley, 2001). Kogu ekstravasatsiooni protsessi soodustab veresoonte laienemise tulemusel aeglustuv verevool. Lisaks leukotsüütide arvule suureneb ka nende poolt sekreteeritud tsütokiinide hulk (Luster jt., 2005), mis osalevad põletiku protsesside moduleerimisel. Akuutse põletiku tekke korral toimub esmalt kiire neutrofiilide hulga tõus veres (Ryan, ja Majno, 1977). Neutrofiilid aktiveeritakse nuumrakkude ning teiste neutrofiilide poolt

vabastatud TNF ja leukotrieenide toimetel, mis võimaldavad nende seondumist endoteeliga ja ekstravasatsiooni (Nathan, 2002). Kui põletiku varajases faasis liiguvad kahjustunud piirkonda eelkõige neutrofiilid, siis hilisemas paranemise faasis suureneb oluliselt mononukleaarsete rakkude osakaal (Ryan, ja Majno, 1977; Morgan jt., 1991). Monotsüütidest diferentseeruvad koe makrofaagid sekreteerivad samuti TNF-i, mis omakorda suurendab ka neutrofiilide liikumist põletikukoldesse. Teiste immuunrakkude poolt sekreteeritud TNF-i, kemokiinide ja prostaglandiin E₂ toimetel migreeruvad kahjustunud piirkonda ka lümfotsüüdid (Yang jt., 1999). Nende seondumine võõrvalkudega põhjustab omakorda makrofaagide aktivatsiooni, mille tulemusel suureneb makrofaagide poolt sekreteeritavate eikosanoidide ja põletikuga seotud tsütokiinide hulk koes veelgi (Nathan, 2002).

Põletiku hilisemas faasis on marginaalse tähtsusega etapp, mil võetakse vastu otsus paranemiseks. Seepeale hakatakse sekreteerima põletikuvastaseid tsütokiine, mis takistavad uute neutrofiilide aktivatsiooni ja migreerumist läbi endoteeli seina (Nathan, 2002). Põletiku indutseerimisel osalenud neutrofiilid suunatakse apoptoosi ning hävitatakse seejärel makrofaagide poolt (Maskrey jt., 2011). Paranemise faasis toimub põletikulises koes ka kemokiinide tootmise vähenemine (Hodge-Dufour jt., 1998). Lisaks põhjustab apoptootiliste neutrofiilide hävitamine makrofaagide poolt anti-inflammatoorsete tsütokiinide vabanemist, mis samuti soodustab koe normaalse seisundi taastamist (Nathan, 2002).

1.2 Suitsetamine

1.2.1 Suitsetamise levimus

Ng ja kaasautorite poolt läbi viidud 187 riiki hõlmavas uuringus hinnati suitsetamisharjumusi 1980-ndatest aastatest kuni 2012. aastani. Laiapõhjalise analüüsi koostamisel kasutasid nad selle ajaperioodi jooksul avaldatud erinevaid suitsetamisega seotud uurimusi, mille hulka kuulusid nii Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) kui ka mitmete teiste terviseuuringutega tegelevate keskuste tulemused. Analüüsist selgus, et 32-aastase perioodi jooksul on suitsetajate hulk meeste seas keskmiselt kahanenud 41,2%-lt 31,1%-ni. Naistel oli suitsetamise osakaal langenud keskmiselt 10,6%-lt 6,2%-ni. (Ng jt., 2014)

Lisaks globaalsetele uuringutele on ka Eestis läbi viidud mitmeid analüüse rahvastiku suitsetamisharjumuste kirjeldamiseks (Pärna jt., 1996; Eesti täiskasvanud rahvastiku tervisekäitumise uuringud, 2004-2015). 1996. aastal teostati põhjalik uuring eestlaste suitseamisharjumuste kohta, millest selgus, et Eesti meestest suitsetab 57,9% ja naistest 25,7% (Pärna jt., 1996). Põhjaliku ülevaate eestlaste suitsetamisharjumuste kohta annavad ka iga kahe aasta tagant läbiviidavad Eesti täiskasvanud rahvastiku tervisekäitumise uuringud (TKU), mille peamiseks valdkondadeks lisaks suitsetamisele on ka toitumise, alkoholi tarbimise, kehalise aktiivsuse, liikluskäitumise, tervise seisundi ning ravimite kasutamise kirjeldamine rahvastikus. TKU kogutud andmete põhjal on igapäevasuitsetajate osakaal nii meeste kui ka naiste hulgas kulgenud langustendentsiga viimase 10 aasta jooksul (joonis 2)^{1 2 3 4 5 6}. 2004. aastal läbiviidud uuringust selgus, et igapäevasuitsetajate hulk meeste hulgas on 48% ja naiste puhul 33%. 10 aastat hiljem tehtud uuringust selgus, et meestest on suitsetajate osakaal langenud 31%-ni ning naistest 22%-ni rahvastikust.

¹ https://intra.tai.ee//images/prints/documents/132039837321_Eesti_taiskasvanud_rahvastiku_tervisekaitumise_uuring_EST_ENG.pdf

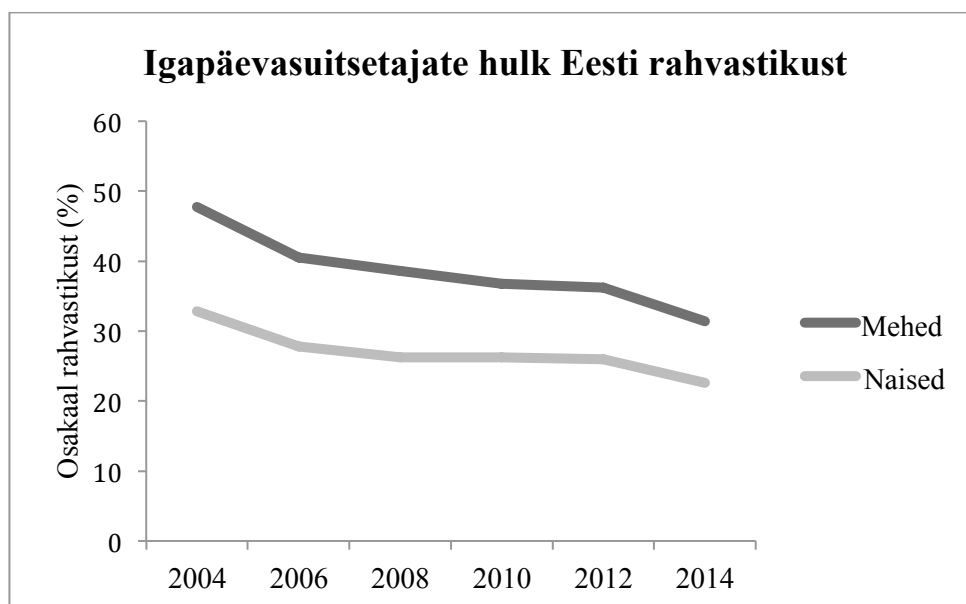
² https://intra.tai.ee//images/prints/documents/13206646576_Eesti_taiskasvanud_rahvastiku_tervisekaitumise_uuring_2006_EST_ENG.pdf

³ https://intra.tai.ee//images/prints/documents/132083925468_Eesti_taiskasvanud_rahvastiku_tervisekaitumise_uuring_EST_ENG.pdf

⁴ https://intra.tai.ee//images/prints/documents/132091796870_Eesti_taiskasvanud_rahvastiku_tervisekaitumise_uuring_EST_ENG.pdf

⁵ https://intra.tai.ee//images/prints/documents/136479842690_TKU_2012.pdf

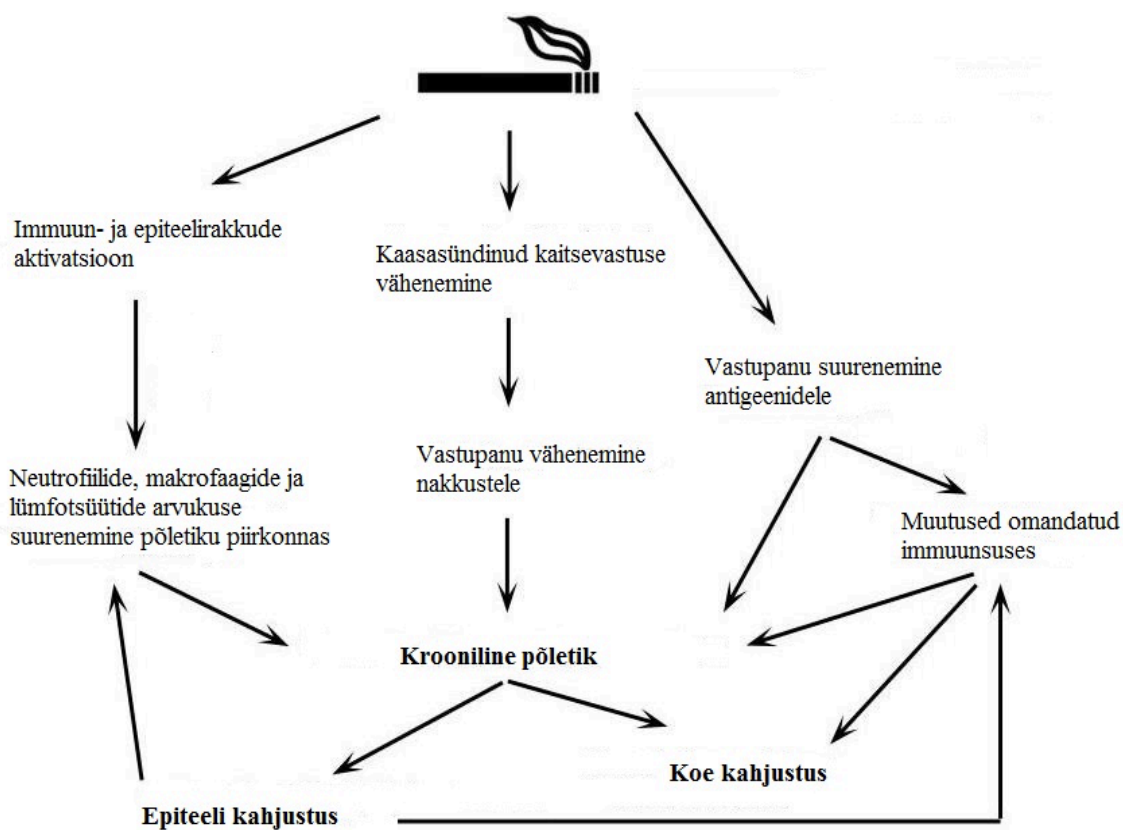
⁶ https://intra.tai.ee//images/prints/documents/14274488161_T2iskasvanud_rahvastiku_tervisekaitumise_uuring_2014.pdf



Joonis 2. Igapäevasuitsetajate osakaal Eesti täiskasvanud rahvastikust. Graafik on koostatud Eesti täiskasvanud rahvastiku tervisekäitumise uuringu andmete põhjal.

1.2.2 Suitsetamise mõju organismile

Suitsetamine on üks peamisi enneaegse surma tekkepõhjuseid maailmas (Conçalves jt., 2011). Pikaajaline suitsetamine põhjustab muutusi kaasasündinud ja omandatud immuunvastuse kujunemisel (Sopori, 2002), mis omakorda soodustab kahjustuste teket erinevates organites (Yanbaeva jt., 2007). Seetõttu kaasneb suitsetamisega ka suurem risk haigestuda südame- ja veresoonkonna haigustesse, vähki, kroonilisse obstruktiivsesse kopsuhaigusesse, autoimmuunhaigustesse või põdeda nakkushaigusi (Conçalves jt., 2011; Lee jt., 2012). Järjepidev suitsetamine põhjustab organismis muutusi, mis soodustavad ka hingamisteede põletiku teket (joonis 3). Varasemalt on mitmetes töödes kirjeldatud, kuidas suitsetamise tagajärjel suureneb oluliselt veres ringlevate leukotsüütide hulk (Hockertz jt., 1994; Morrison jt., 1999; Winkel ja Statland, 1981), millest suurima osakaaluga on just neutrofiilide arvu tõus (Ziegler-Heitbrock jt., 2010). Leukotsüütide hulga suurenemisest tingituna tõuseb suitsetajatel neutrofiilide, makrofaagide ja eosinofiilide hulk ka kopsus (Mehta jt., 2008; Sopori, 2002). Lisaks arvukuse tõusule tekivad põletiku korral muutused ka vererakkude fenotüübis (van Eeden jt., 2000). Suitsetamisest tingitud süsteemse põletiku leevendamiseks suureneb immuunrakkude poolt toodetavate nii pro- kui ka anti-inflammatoorsete tsütokiinide hulk (Arnson jt., 2010), mis indutseerib leukotsüütide suunatud liikumist põletikulisse piirkonda (Floreani ja Rennard, 1999).



Joonis 3. Skeem suitsetamise ja põletiku tekkimise seostest. Suitsetamine avaldab negatiivset mõju immuunrakkudele, mille tulemusel nõrgeneb nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunsus. Sellest tulenevalt väheneb organismi vastupanuvõime nakkustele ning tekib krooniline põletik, mis soodustab koe ja epiteelikahjustuste teket. Muudetud (Lee jt., 2011).

Suitsetamise intensiivsuse määramiseks kasutatakse kvantitatiivse ühikuna pakk-aastat. Üks pakk-aasta on võrdne 20 suitsetatud sigaretiga päevas ühe aasta vältel (Prignot, 1987). Suitsetamise intensiivsust pakk-aastates kasutatakse eelkõige kliinilistes uuringutes selle mõju analüüsimiseks (Wood jt., 2005).

Suitsetamise pakk-aastate arvutamiseks rakendatakse alljärgnevat valemit:

$$\text{Pakk} - \text{aasta} = \frac{\text{suitsetatud sigarettide arv päevas} \times \text{suitsetamise staaž (aastates)}}{20}$$

Suitsetamise negatiivne mõju organismile on tingitud tubakatoodete toksilistest koostisosadest, kuna komponentide sissehingamisel tekib otsene kontakt kemikaalide ning hingamisteede rakkude vahel.

1.2.3 Sigareti suits

Sigareti suits sisaldab üle 4500 erineva kemikaali, mis avaldavad organismile nii toksilisi, mutageenset kui ka kantserogeenset mõju (Bluhm jt., 1971; Ding jt., 2008; Mehta jt., 2008). Suitsu kahjulikkus tuleneb eelkõige põlemise käigus, mille käigus tekivad nii aurustunud kui ka tahkel kujul toksilised ühendid (Bluhm jt 1971). Sigareti suitsu üheks põhiliseks koostisaineks on nikotiin, mille tarbimine põhjustab sõltuvust. Suitsetamisel imendub nikotiin koos teiste toksiliste ühenditega kokkupuutel hingamisteedega vereringesse, milles toimub ainete edasikandumine kogu organismis. Nikotiin seondub ajus asuvate nikotiini-atsetüülkoliini retseptoritega. Selle tagajärjel vallandub dopamiin, millega omakorda kaasneb lühiajaline heaolutunde tekkimine. Suitsetamisest tingitud nikotiini toime põhjustab retseptorite hulga suurenemist, mis omakorda soodustab sõltvuse teket (Gracia, 2005). Lisaks nikotiinile sisaldab sigareti suits suures osas ka tõrva ja organismile toksilist süsikinoksiidi (CO), mis soodustab südamehaiguste tekkeriski (Zevin jt., 2001). Sigaretid sisaldavad suurel määral ka erinevaid raskemetalle. Seal leidub alumiinimit, niklit, mangaani, seleeni, tsinki ja teisi metalle (Bernhard jt., 2005; Lee jt., 2012). Varasemalt on näidatud, et suitsetajate veres ja uriinis on oluliselt suurenenud ka tubakataimedes sisalduva toksilise toimega raskemetalli kaadmiumi tase (Chiba ja Masironi, 1992). Lisaks on teada, et suitsetajatel esineb kopsudes oluliselt rohkem krooni (Pääkko jt., 1989), mille kõrge tase soodustab erinevate vähivormide teket ja hingamisteede patoloogiat (Bernhard jt., 2005). Sigareti suits sisaldab ka tubakataimedest pärinevat niklit, mis seondudes CO-ga avaldab organismile potentsiaalset kantserogeenset mõju (Chiba ja Masironi, 1992).

Eestis reguleerib tubakatoodete tarbimist tubakaseadus, millega on reglementeeritud kogu tubakatoodetega seonduvad õigused ja keelud. Seadusega on sätestatud kindlad normid sigarettide tõrva, nikotiini ja CO sisaldusele (§ 8). Üldnõuete kohaselt ei tohi tubakatoodete pakendil kasutada märgistust, mis võib tarbijat selle sisu kohta eksitada (§ 11). Lisaks kehtivad kindlad nõuded toote etiketile lisatavate tubakatoodete terviseohu hoiatuste kohta (§ 13).⁷

⁷<https://www.riigiteataja.ee/akt/903024>

1.2.4 E-sigaretid

Elektrooniline sigaret ehk e-sigaret on patareidel põhinev seade, milles e-sigareti vedelik ehk e-vedelik kuumutatakse sissehingatavaks auruks. E-sigaret koosneb kolmest põhilisest komponendist: patarei, kuumutamiselement ja korduvtäidetav kassett vedeliku tarbeks (Willershausen jt., 2014). E-sigaret on alternatiivseks vahendiks suitsetamisele, mille suurem levik on toimunud viimasel dekaadil. Algselt toodeti neid väikestes Hiina ettevõtetes ning turundati peamiselt interneti kaudu (Pisinger ja Døssing, 2014). Elektroonilised sigaretid jõudsid Euroopa ja Ameerika turgudele alates 2006ndast aastast (Noel jt., 2011), mil suured tubakatööstuse ettevõtted arendasid välja oma e-sigarettide brändid. E-sigareti vedeliku põhiosa moodustavad nikotiin, maitse- ja lõhnaained ning niisutaja (Bahl jt., 2012). Niisutajatena kasutatakse propüleen glükooli ja taimset glütseriini. Võrreldes tavalise suitsuga sisaldab e-sigareti vedelik oluliselt vähem erinevaid kemikaale, kuid nende kasutamisel hinnatakse peamiseks ohu allikaks just vedelikes sisalduvaid maitse- ja lõhnaaineid, mille otsene mõju tervisele ei ole teada. Selleks, et toode oleks atraktiivne erinevale tarbijaskonnale, on valikus väga suur hulk erinevaid maitse- ja lõhnaaineid, mis varieeruvad traditsioonilisest tubakamaitsest kuni spetsiifiliste puuvilja essentsideni. Lisaks erineva nikotiini kontsentratsiooniga elektroonilistele vedelikele on tootevalikus samade lõhna- ja maitseainetega ka nikotiini mittesisaldavad vedelikud.

2014. aastal teostatud Eesti täiskasvanud rahvastiku terviseuuringu tulemustest selgus, et e-sigaretid on traditsiooniliste tubakatoodete kõrval kõige levinum tubakatoode⁸. Kuid Eesti Vabariigi tubakaseaduses on elektrooniliste sigarettide kohta reglementeeritud ainult täitevedeliku pakendi mahu piirmäärad (§ 17)⁹. Hetkel on valitsusel kavas Euroopa Parlamendi ja Nõukogu direktiivi 2014/40/EL kehtestamine, mille eesmärk on piirata e-sigarettide müüki ja tarbimist ning ühtlustada kõigis Euroopa Liidu liikmesriikides kehtivaid nõudeid.¹⁰

⁸ https://intra.tai.ee/images/prints/documents/14274488161_T2iskasvanud_rahvastiku_tervisek2itumise_uuring_2014.pdf

⁹ <https://www.riigiteataja.ee/akt/903024>

¹⁰ http://ec.europa.eu/health/tobacco/docs/dir_201440_et.pdf

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesolev magistritöö on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on uurida suitsetamise mõju leukotsüütide alampopulatsioonidele ning tuvastada suitsetamisest tingitud põletiku ja hingamisteede haiguste algupäraseid tekkemehhanisme. Uurides suitsetamise mõju vere rakulisele koostisele loodame leida juhtnööre, miks ainult osadel inimestel arenevad välja suitsetamisest tulenevad haigused. Saadav informatsioon võib olla abiks põletikuga seotud krooniliste hingamisteede ja kopsuhaiguste varasemaks tuvastamiseks ja seeläbi ka potentsiaalse ravi väljatöötamise lihtsustamiseks.

Käesoleva magistritöö eesmärkideks on:

- anda ülevaade suitsetamise epidemioloogiast ECRHS uuringus osalenud Tartumaa elanike põhjal;
- teha kindlaks, kas varasem ja ka praegune suitsetamine põhjustavad muutusi vere rakulises koostises;
- uurida, kuidas mõjutavad sigareti suitsu kondensaat ja e-sigareti vedelikud mittersuitsetajate, endiste suitsetajate ja suitsetajate leukotsüütide elulemust rakukultuuri tingimustes.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Valim

ECRHS (Euroopa elanike hingamistervise uuring, ingl *European Community Respiratory Health Survey*) on kolmest faasist koosnev uuring, mille jooksul koguti 25 erineva riigi rahvaste andmeid. Uuring algatati 1980. aastatel üle maailma levima hakanud astma juhtumite ajendil. Esimene faasi viidi läbi 1993. aastal ning sinna kaasati indiviidid vanuses 20-44 aastat. Teine faas viidi läbi aastatel 2001-2002 ja kolmas faas aastatel 2013-2014, kuhu kutsuti vabatahtlikkuse alusel uuesti kõik esimeses uuringu faasis osalenud inimesed. Kõik uuringu faasid sisaldasid põhjaliku küsimustiku täitmist ja kliinilist osa. Kliinilises faasis koguti patsientide vereproovid, teostati nahatorketestid levinumate allergeenidega ning viidi läbi spirograafilised analüüsid.¹¹

Käesolev magistritöö on teostatud ECRHS projekti raames kogutud Tartumaa elanike vereproovide põhjal, mis pärinevad uuringu kolmandast faasist. Kõikide patsientide vereproovid koguti Tartu Ülikooli Kliinikumi Kopsukliiniku meditsiinitöötajate poolt liitiumhepariiniga vaakumkatsutitesse (*Greiner Bio-One*, Austria). Uuringu kolmandas faasis osales kokku 94 inimest. Eksitavate tulemuste vältimiseks on uuringust välja arvatud patsiendid, kes olid tarvitanud hormonaalseid ravimeid vereloovutamisele eelneva poole aasta jooksul. Selle kriteeriumi alusel langes uuringust välja 9 ning üldvalimi suuruseks jäi 85 indiviidi. Käesolevas töös kasutati suitsetamise epidemioloogiliseks iseloomustamiseks kõigi uuringu faasides osalenud indiviidide andmeid. Suitsetamise mõju hindamiseks leukotsüütide alampopulatsioonidele analüüsiti 85 uuringu kolmandas faasis osalenud inimese andmeid (tabel 1). Sigareti suitsu kondensaadi ja e-sigareti vedelike mõju hindamiseks leukotsüütide elulemusele kaasati rakukultuuri katsetesse 28 indiviidi (tabel 1). Iga rühma valimi koostamisel rakukultuuri katsete jaoks lähtuti külmutatud rakkude arvust, mis oleks piisav eksperimentide teostamiseks. Endiste ning praeguste suitsetajate rühmades oli patsientide valiku aluseks ka suitsetamise intensiivsus pakk-aastates. Rakukultuuri eksperimentidesse ei kaasatud indiviide, kelle suitsetamise intensiivsus jäi alla 7 pakk-aasta.

¹¹ www.ecrhs.org

Mittesuitsetajateks loeti inimesi, kes ei ole elu jooksul varasemalt suitsetanud. Endiste suitsetajate hulka kuuluvad need, kes on varasemalt suitsetanud, kuid loobunud tubakatoodetest. Suitsetajate rühma kuuluvad inividid, kes tarvitasid tubakatooteid uuringus osalemise ajal.

Tabel 1. WBC diferentsiaalloenduse ja rakukultuuri katsetes analüüsitud indiviidide rühmade andmed vastavalt soole ja suitsetamisharjumustele. Tabelis on esitatud rühmade valimi suurused eraldi meeste ja naiste kohta, M – mees, N – naine. Vanused on esitatud aastates, sulgudes on märgitud rühma kuulunud valimihulga vanusevahemik.

	Diferentsiaalloendus n = 85	Rakukultuur n = 28
Sugu (M/N)	25 / 60	14 / 14
Vanus (M/N)	51,8 (40,5-63,5) / 52,3 (40-64)	51,6 (40,5-62) / 53,8 (42-63)
Mittesuitsetajad (M/N)	10 / 38	5 / 5
Endised suitsetajad (M/N)	6 / 17	4 / 5
Suitsetajad (M/N)	9 / 5	5 / 4

Kõik osalejad on andnud kirjaliku nõusoleku enda vereproovide kasutamiseks teaduslikel eesmärkidel. Anonüümsuse tagamiseks on uuringus osalenute nimed teadmata ning igale indiviidile määratud numbriline kood. Uurimistöö teostamiseks on saadud luba Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetika Komiteelt (luba 209T-17).

Antud uurimustöö projekti alustas käesoleva töö juhendaja ja Tartu Ülikooli doktorant Berit Pilden-Sarv. Magistritöö autor võttis projekti üle 2014. aastal. Sellest tulenevalt on Berit Pilden-Sarv osalenud leukotsüütide eraldamise ja rakkude külmutamise protseduurides ning esialgses WBC diferentsiaalloenduse teostamises.

2.2.2 Leukotsüütide eraldamine

Leukotsüütide eraldamiseks tsentrifuugiti kõigepealt rakke 1150xg 10 min 4°C juures. Peale fuugimist eemaldati supernatant ning rakud resuspendeeriti töölahuses (TL) (1% FBS, 2 mM EDTA, 1x PBS). Järgnevalt lüüsi erütrotsüüdid osmootselt. Selleks lisati rakkudele külma steriilset vett ja loksutati 25 sek. Lüüsingut peatamiseks lisati rakkudele 10x fosfaat-puhverdatud soolalahust (PBS, ingl *phosphate buffered saline*, Lonza) suhtes 1:10-le. Tuub täideti TL-ga kuni 50 ml-ni ning rakke tsentrifuugiti 350xg 10 min 4°C. Peale fuugimist aspireeriti supernatant ning rakud resuspendeeriti 1 ml TL-s. Lüüsingut protseduuri korrati vastavalt vajadusele 2 või 3 korda

kuni supernatant muutus läbipaistvaks. Peale viimast lüüsingut protsessi resuspendeeriti rakud 1 ml-s 20% FBS (*Sigma-Aldrich*) DMEM (Dulbecco modifitseeritud *Eagle*'i sööde, ingl *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, *Naxo*) söötmes.

Rakkude lugemiseks lisati rakususpensioonile trüpaansinist (*Sigma-Aldrich*), loendamiseks kasutati valgusmikroskoopi 400x suurendusega ning hemotsütomeetrit (*Marienfeld*), milles loeti kokku 5 A-ruudus olevad rakud. Saadud tulemuste põhjal arvutati rakkude kontsentratsioon lahuses, tõsteti kõrvale tsütospinnide tegemiseks vajalik rakumaterjal ning ülejäänud rakud külmutati.

2.2.3 Leukotsüütide külmutamine

Leukotsüütide külmutamiseks valmistati külmutussegu, mis sisaldas 60% DMEM (*Naxo*), 20% FBS (*Sigma-Aldrich*) ja 20% dimetüülsulfoksiid (DMSO, *Sigma-Aldrich*). Külmutamiseks lisati krüoviaalidesse 1:1 suhtes rakususpensiooni ja külmutussegu lõppmahuga 1 ml ning tihedusega 10×10^6 rakku/ml. Rakke inkubeeriti koos külmutusseguga 30 min jääl, et DMSO imenduks rakkudesse. Seejärel asetati krüoviaalid üleöö -86°C sügavkülma koos spetsiaalselt rakkude külmutamiseks välja töötatud *CoolCell* (*BioCision*) mahutiga, milles temperatuur alaneb fikseeritud kiirusel $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Rakkude pikaaegseks säilitamiseks tõsteti krüoviaalid hiljem ümber vedelasse lämmastikku.

2.2.4 Tsütospinnid

WBC diferentsiaalloenduse läbiviimiseks planeeriti tsütospinnidele 50 000 rakku iga preparaadi kohta. Lähtudes rakususpensiooni tihedusest tõsteti iga slaidi kohta vastav kogus rakke tuubidesse, mis täideti 1x PBS-ga ja seejärel koguti rakud tsentrifuugimise teel. Vastavalt planeeritud tsütospinnide arvule patsiendi kohta lisati rakkudele iga valmistatava preparaadi jaoks 100 μl 1x PBS lahust. Tsütospinnide tegemiseks kasutati tsütotsentrifuugi *Cytospin*TM 4 *Cytocentrifuge* (*Thermo Scientific*) režiimil 1500 rpm 6 min vältel.

2.2.4.1 May-Grünwald – Giemsa värving

Preparaatide värvingul kasutati May-Grünwald (*Sigma-Aldrich*) ja Giemsa (*Merck KGaA*) värve. Värvilahuste valmistamisel lähtuti tootjapoolsetest soovitustest. Preparaate hoiti kõigepealt May-Grünwald värviseigus 10 min ja loputati 3x destilleeritud vees. Seejärel asetati preparaadid 15 minutiks Giemsa värvi, korraldati loputamisprotseduuri ning lasti kuivada. Rakkude mikroskoopiliseks vaatluseks märjati alusklaasid ksüleenis ning kinnitati katteklaasid *Vitro-Clud* (*Deltalab*) liimiga.

2.2.4.2 Leukotsüütide diferentsiaalloendus

Loendamiseks kasutati valgusmikroskoopi Nikon *ecclipse Ci*, immersioonõli ja 1000x suurendust. Iga patsiendi kohta loendati 500 rakku, mille põhjal arvutati lümfotsüütide, monotsüütide, neutrofiilide, eosinofiilide ning basofiilide osakaalud protsentides. Loendamiseks kasutati spetsiaalset WBC diferentsiaalloendust võimaldavat masinat *345/15 Assistant Counter AC-15*.

2.2.5 Leukotsüütide rakukultuur

Rakukultuuri katsed viidi läbi ECRHS uuringus osalenud indiviidide verest eraldatud leukotsüütide põhjal. Kõik rakukultuuri eksperimentide jaoks vajalikud eelnevad optimeerimiskatsed teostati vabatahtliku naispatsiendi verest eraldatud WBC-ga. Eeeksperimentide käigus viidi läbi nii tsentrifuugimise kui ka sigareti suitsu kondensaadi (CSC, ingl *cigarette smoke condensate*) ja e-sigareti vedelike kontsentratsioonide optimeerimiskatsed.

Suitsetamise mõju hindamiseks inimese vere primaarsetele rakkudele *in vitro* tingimuses kasutati referentssigaretidest 3R4F kogutud sigareti suitsu kondensaati (*Murty Pharmaceuticals*). CSC on teaduslikes eksperimentides kasutatav referentssigaret suitsetamise mõju uurimiseks rakkudele. Vastavalt tootjapoolsele informatsioonile koguti CSC spetsiaalse masina abil ning lahustati DMSO-s lõppkontsentratsiooniga 40 mg/ml. Rakukultuuri katsetes uuriti paralleelselt tavasigaretiga ka e-sigareti vedelike mõju leukotsüütidele. Rakkude stimuleerimiseks kasutati 0 mg/ml ja 18 mg/ml nikotiini kontsentratsioonidega maitseta e-sigareti baasvedelikke (*eCig*

Hellas) ning 0 mg/ml ja 18 mg/ml nikotiini kontsentratsioonidega tubakamaitsetelisi e-sigareti vedelikke (*Changning Dekang Biotechnology Co.*).

2.2.5.1 Leukotsüütide sulatamine

Rakkude sulatamiseks võeti krüoviaalid vedela lämmastiku hoidlast ning toimetati kiiresti 37°C vesivanni, kus neid hoiti ~2 minut, kuni peaaegu kogu külmutatud rakusegu oli sulanud. Seejärel lisati rakud 1:10 suhtes 37°C juures eelsoojendatud 1% penitsilliin ja streptomütsiin seguga (*Sigma-Aldrich*) DMEM (*Naxo*) söötmesse.

2.2.5.2 Tsentrifuugi programmi optimeerimine

Rakud sulatati vastavalt eelmises peatükis mainitud viisil. Rakkude elulemust analüüsiti 7 programmi võrdlemisel ning kõik katsed viidi läbi kolmes paralleelses korduses. Elulemuse hindamiseks loendati rakke kõigepealt hemotsütomeetri 5 A-ruudus vahetult peale sulatamist. Seejärel jaotati rakud võrdselt erinevatesse tuubidesse nii, et kõigi võrreldavate programmide kohta tekkis kolm erinevat tuubi. Järgnevalt viidi läbi tsentrifuugimised ning loendati igas tuubis olnud rakud. Selleks eemaldati rakkudel supernatant ning resuspendeeriti 0,1 ml DMEM (*Naxo*) söötmes. Enne ja peale tsentrifuugimist loendatud rakkude arv võeti aluseks nende elulemuse hindamiseks vastavalt fuugimisprogrammile. Sobivaima variandi tuvastamiseks kasutati tabelis 2 esitatud programme. Katse viidi läbi nii, et kõigepealt tsentrifuugiti rakke erinevatel kiirustel 10 min vältel ning parima rakkude elulemusega kiirust kasutati järgnevalt fuugimisprogrammi aja optimeerimiseks. Kõik katsed viidi läbi *Eppendorf 5810 R* tsentrifuugiga.

Tabel 2. Tsentrifuugi optimeerimiskatses võrreldud programmid. Tsentrifugimiskiirus on esitatud nii rcf (suhteline tsentrifugaaljõud) kui ka rpm (pööret minutis) ühikutes.

Programm	rcf (g)	rpm	aeg (min)	temperatuur (°C)	kiirendus/aeglustus
1	25	400	10	37 °C	0
2	56	600	10	37 °C	0
3	100	800	10	37 °C	0
4	157	1000	10	37 °C	0
5	56	600	5	37 °C	0
6	56	600	15	37 °C	0
7	56	600	20	37 °C	0

2.2.5.3 CSC ja e-sigareti vedelike kontsentratsioonide optimeerimine

Töös uuritud tubakatoodete erinevate kontsentratsioonide hindamiseks rakkude elulemusele rakukultuuri tingimustes teostati eelnevad kontsentratsioonide optimeerimiskatsed. Eeleksperimendi käigus viidi läbi optimeerimistaksed kolmel erineval kontsentratsioonil 10x kontsentratsioonide erinevusega. Kõik eksperimendid teostati kolmes korduses, mille põhjal arvutati rakkude keskmine elulemus. Katses kasutati CSC ning tubakamaitsetelise ja maitseta e-sigareti vedelikke kontsentratsioonidel 1,8 µg/ml, 18 µg/ml ja 180 µg/ml. Optimaalseima kontsentratsiooni valikul lähtuti WBC elulemuse hindamisest peale rakukultuuri stimulatsioone ning seejärel tehtud tsütopinnide kvaliteedist (peatükk 2.2.4).

2.2.5.4 Leukotsüütide rakukultuur

Kõikide ECRHS III uuringus osalenud indiviidide rakud võeti vedela lämmastiku hoidlast ning sulatati eelpool mainitud viisil (peatükk 2.2.5.1). Seejärel tsentrifuugiti rakke 56xg 10 min, 37°C juures. Peale fuugimist aspireeriti supernatant ning rakud resuspendeeriti 10% inimseerumi (*Sigma-Aldrich*) ja 1% penitsilliin-streptomütsiin (*Sigma-Aldrich*) seguga DMEM söötmes (*Naxo*). Järgnevates etappides kasutatakse samuti viimati mainitud inimseerumit ja antibiootikumi sisaldavat söödet. Seejärel võeti loendamiseks rakusegu, millele lisati 1:1 suhtes trüpaansinist (*Sigma-Aldrich*). Elusrakkude populatsiooni hindamiseks loendati hemotsütomeetri 5 A-ruudus olevad rakud. Vastavalt rakkude hulga valmistati kultuuri istutamiseks rakkude ja söötme segu elusrakkude tihedusega 50 000 rakku/180 µl. Rakud istutati 96-kannulisele plaadile lõppruumalas 200 µl ning neid inkubeeriti 6 tundi 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas.

CSC on vastavalt tootjapoolsele informatsioonile lahustatud DMSO-s. Seetõttu kasutati sigareti suitsu kondensaadi kontrollina rakkude stimuleerimiseks ka DMSO-t, mida lisati sama lahjendusfaktoriga nagu CSC-d. Tubakamaitseteliste e-sigareti vedelike lõhna-ja maitseainete mõju uurimiseks leukotsüütidele kasutati kontrollina maitseta e-sigareti baasvedelikku. Nikotiini mõju hindamiseks leukotsüütidele lisati ilma nikotiinita e-sigareti vedelikke sama lahjendusfaktoriga nagu 18 µg/ml nikotiini kontsentratsiooniga vedelikke. Negatiivse kontrollina inkubeeriti leukotsüüte rakukultuuri katsetes kõiki komponente sisaldavas söötmes, millele ei lisatud täiendavat stimulatsiooni.

Iga indiviide leukotsüütide kohta tehti negatiivne kontroll ning 6 erinevat stimulatsiooni:

- 1) negatiivne kontroll;
- 2) DMSO stimulatsioon;
- 3) CSC stimulatsioon 18 µg/ml;
- 4) maitseta e-sigareti baasvedeliku stimulatsioon 0 mg/ml;
- 5) maitseta e-sigareti baasvedeliku stimulatsioon 18 µg/ml;
- 6) tubakamaitselise e-sigareti vedeliku stimulatsioon 0 mg/ml;
- 7) tubakamaitselise e-sigareti vedeliku stimulatsioon 18 µg/ml.

Rakukultuuri eksperimentides lähtuti põhimõttest viia kõikide indiviide stimulatsioonide katsed läbi kolmes korduses. Kuna katses kasutati limiteeritud kogusega inimese primaarseid WBC, siis ei olnud kõigi indiviidide iga stimulatsiooni kohta võimalik läbi viia kolme kordust. See mitmes korduses iga stimulatsioonikatse tehti selgus rakkude loendamisel peale tsentrifuugimist. Tulenevalt inimese primaarsete rakkude eripärast ning asjaolust, et kõik rakud on pärit erinevatelt patsientidelt, ei esinenud rakkude loendamisel peale tsentrifuugimist ühesugust elulemusprotsenti ja seega ei olnud võimalik stimulatsioonide paralleelkatsete hulka ka eelnevalt ette ennustada.

Peale 6 h inkubatsiooni eemaldati iga stimulatsiooni katse kohta rakukultuuri supernatant 150 µl mahus. Seejärel suspendeeriti rakud allesjäänud 50 µl söötmes ning viidi läbi uus loendamine elulemuse hindamiseks peale rakukultuuri stimulatsioone. Selleks loendati rakud hemotsütomeetris eelnevalt mainitud viisil. Rakkude väljapesuks lisati kõikidele kultuuridele eelsoojendatud 1x PBS-i. Seejärel tõsteti sama stimulatsiooni rakud ühte tuubi, mis koguti tsentrifuugimisel ning valmistati tsütospinnid (peatükk 2.2.4) CSC ja e-sigareti vedelike mõju hindamiseks leukotsüütide alampopulatsioonidele.

2.2.6 Statistilised analüüsid

Suitsetamise ja tubakatoode mõju hindamiseks leukotsüütidele kasutati *Statview* tarkvara. Erinevate rühmade analüüsimiseks kasutati *Mann-Whitney U* ja *Kruskal-Wallis* teste. *Kruskal-Wallis* testi rakendati enam kui kahe rühma omavaheliseks võrdlemiseks ning *Mann-Whitney U* testi kahe rühma võrdlemiseks. Tulemused on graafikutel esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. Statistiliselt oluliseks loetakse $P < 0.05$ väärtusi.

2.3 Tulemused

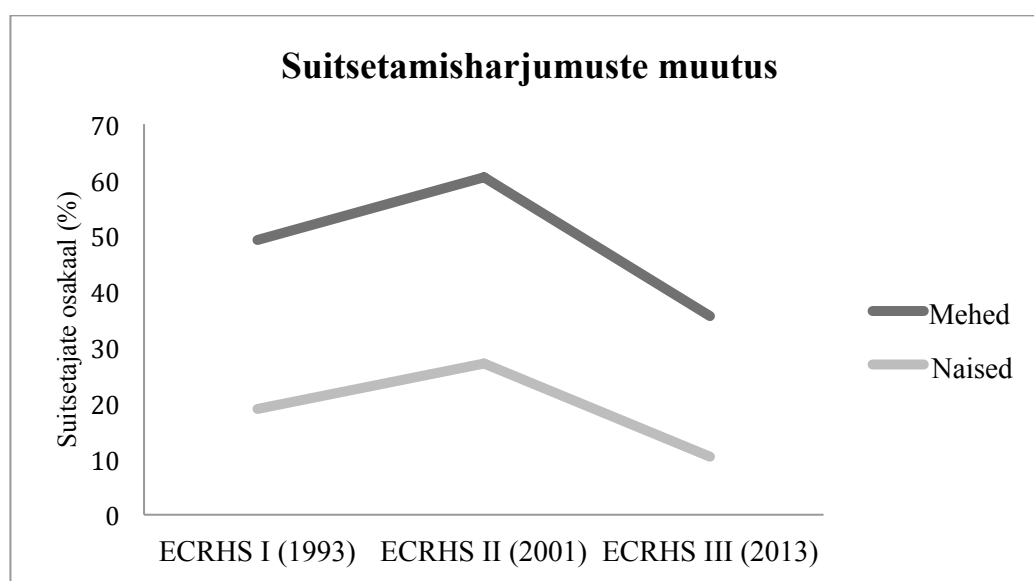
2.3.1 Suitsetamise epidemioloogia ECRHS uuringu andmete põhjal

Euroopa elanike hingamistervise uuring viidi paralleelselt läbi 25. Euroopa riigis, sealhulgas ka Eestis. Uuringu eesmärgiks on analüüsida Euroopa elanike hingamisteede tervislikku seisundit pikema perioodi vältel. ECRHS koosneb kokku kolmest faasist: ECRHS I, ECRHS II ja ECRHS III, mis sisaldasid nii kirjaliku osa küsimustiku täitmist kui ka kliinilist osa. ECRHS I raames saadeti posti teel küsimustikud 3000-le juhuslikult valitud Tartumaa elanikule, kellest 2642 nõustusid uuringus osalema. Arstlikul ülevaatusel osales kokku 556 patsienti, kellest 127-le teostati kliinilised uuringud. Kliinilistesse uuringutesse kutsuti patsiendid juhusliku valiku alusel. Neilt võeti vereproovid, tehti nahatorketestid levinumate allergeenidega ning viidi läbi spirograafilised uuringud. ECRHS II raames saadeti 2001. aastal kõigile esimeses katsefaasis osalenud 2642 patsiendile uued küsimustikud. Nendest 1624 indiviidi osalesid ka teises faasis, kellest kliinilistele testidele kutsuti 336 patsienti. Uuringu kolmandas faasis 2013. aastal osales uuesti 1311 patsienti, kes täitsid kirjaliku küsimustiku. ECRHS III raames osales uuringu kliinilises faasis 94 patsienti, kes olid läbinud analoogsed testid ka uuringu esimese ja teise faasi ajal.

Tulenevalt osalejate vastustest uuringu kirjaliku küsimustiku täitmisel oli antud informatsiooni põhjal võimalik analüüsida suitsetamisharjumuste muutusi Tartumaa elanike hulgas 20 aastase perioodi vältel. ECRHS I raames osalenud indiviididest on elu jooksul suitsetanud 70% meestest ning 30% naistest. Seejuures vastas 20% meestest ja 11% naistest, et nad on suitsetamisest loobunud. Esimeses faasis osalenud indiviididest polnud kunagi suitsetanud 31% meestest ning 70% naistest. Seitse aastat hiljem läbiviidud ECRHS II raames osalenutest oli elu jooksul suitsetanud 65% meestest ning 32% naistest. Endiste suitsetajate hulk oli nii meestel kui ka naistel 5% uuringus osalenud indiviididest. Meestest moodustasid mittesuitsetajad 35% ning naistest 68% patsientidest. Esimesest faasist 20 aastat hiljem viidi läbi ECRHS III, mille küsitluste põhjal selgus, et elu jooksul suitsetanuid osales uuringus meestest 63% ning naistest 30%. Nii naiste kui ka meeste hulgas oli tõusnud endiste suitsetajate osakaal, mis meestel ulatus 27%-ni ning naistel 20%-ni, seejuures oli mittesuitsetajaid meestest 37% ning naiste hulgas 70%.

Tulemustest avaldub, et 20 aastase perioodi vältel on inimesed vähendanud suitsetamisharjumusi. Uuringu esimeses faasis 1993. aastal oli suitsetajaid 20-44 aastaste Tartumaa meeste

hulgas 49% ning naiste hulgas 19% (joonis 4). Samas 2001. aastal läbi viidud ECRHS II raames selgus, et suitsetajate osakaal on meeste hulgas tõusnud 61%-ni ning naistel 27%-ni. Kuna uuringu teises faasis oli invidiide vanus 28-52 aastat võib arvata, et selles vanusevahemikus on inimesed hakanud rohkem suitsetama. Seevastu ECRHS III tulemustest ilmnes, et suitsetajate osakaalud on vähenenud meeste hulgas 36%-ni ning naistel 10%-ni, mil patsiendid olid 40-64 aasta vanused. Võrreldes uuringu teise faasiga on ECRHS III osalenud meeste hulgas suitsetajate protsent vähenenud 25% võrra ning naistel omakorda 17% võrra. Toetudes uuringus osalenud indiviidide küsimustike vastustele saab väita, et kõrgemas vanuses vähendatakse suitsetamisharjumusi.



Joonis 4. ECRHS uuringus osalenud Tartumaa elanike suitsetamisharjumuste muutused 20 aastase perioodi jooksul. Graafikul on esitatud suitsetajate protsent uuringus osalenud patsientidest meeste ja naiste kohta. Sulgudes on märgitud aastad, millal uuringu erinevad etapid teostati.

2.3.2 ECRHS osalejate iseloomustus

Käesoleva magistritöö eksperimentaalne osa põhineb ECRHS III uuringus osalenud indiviidide vererakkude põhjal. Valimi iseloomustamise aluseks on ECRHS uuringus osalenud patsientide poolt täidetud kirjalikud küsimustikud, millel iga indiviid märkis kokkupuute suitsetamisega. Patsiendid vastasid küsitluslehele, kas nad suitsetavad, on kunagi varem suitsetanud ja selle lõpetanud või pole kunagi suitsetanud. Küsimused hõlmasid ka informatsiooni, mis vanuses suitsetama hakati, kui pikk on suitsetamise staaž ning mitu sigaretti päevas keskmiselt

suitsetatakse. Lisaks saadi küsimustike põhjal ka informatsiooni, kas suitsetamisharjumused on aja jooksul muutunud ning endised suitsetajad märkisid ka aja, millal nad on suitsetamise lõpetanud. Täidetud küsimustikest saadi ka informatsiooni, kas inimesed on tarvitanud viimase poole aasta jooksul hormonaalseid ravimeid. Varasemalt on näidatud, et hormoonide manustamisel suureneb granulotsüütide, eelkõige neutrofiilide osakaal (Liles jt., 1995; Nagakawa jt., 1998) ning seetõttu väheneb lümfotsüütide hulk veres (Breitenfeld jt., 1978; Chatham ja Kimberly, 2001). Kuna hormoonravimid mõjutavad leukotsüütide proportsioone, otsustati tulemuste usaldusväärsuse tagamiseks need patsiendid käesoleva töö raames läbiviidud eksperimentaalsest osast välja jätta. Seega osutus lõpliku valimi suuruseks 85 patsienti, kes jaotati vastavalt soole ja suitsetamisharjumustele 6 erinevasse rühma. Grupeerimise aluseks võeti uuringu raames täidetud küsimustikest saadud andmed, mille põhjal analüüsiti eraldi suitsetajate, endiste suitsetajate ja mitesuitsetajate rühmasid naiste ja meeste osas. Sama rühmitust rakendati ka rakukultuuri katsetesse kaasatud 28 patsiendiga.

Käesoleva magistritöö leukotsüütide diferentsiaalloenduse ja rakukultuuri eksperimentides kasutati küll samu patsiente, kuid rakukultuuri eksperimentides kasutati väiksemat valimit, mistõttu esinesid mõned erinevused uuritavaid rühmasid iseloomustavates väärtustes (tabel 3). Gruppidevaheline meeste keskmine vanus varieerus 49,5-55 aasta piires. Endiste kui ka praeguste suitsetajate grupis esinevad olulised erinevused suitsetamise intensiivsuse kestvuse vahel. Kui endiste suitsetajate rühmas suitsetati keskmisel 17,5 aastat keskmise intensiivsusega 15,7 pakk-aastat, siis suitsetajate rühmas olid vastavad näitajad 33,9 aastat ja 30,6 pakk-aastat. Seevastu naiste keskmine vanus varieerus grupiti kõigest 52-53,5 aasta vahel. Sarnaselt meestele ilmnis ka naiste rühmades märgatav erinevus suitsetamise intensiivsuse ja kestvuse vahel endistel ja praegustel suitsetajatel. Naiste puhul oli endiste suitsetajate keskmine suitsetamise staaž 18 aastat ning intensiivsus 9,3 pakk-aastat. Suitsetajate rühmas olid vastavad näitajad 31 aastat ja 19,1 pakk-aastat. Silmatorkavaim erinevus ECRHS III üldvalimi ja rakukultuuri katsete jaoks kasutatud valimis esines meespatsientide endiste suitsetajate rühmas, kus üldvalimi suitsetamise intensiivsus oli keskmiselt 15,7 pakk-aastat, kuid rakukultuuri rühmas 20,3 pakk-aastat. Sedavõrd suur erinevus oli tingitud ühest meespatsiendist, kelle suitsetamise intensiivsus oli 3 pakk-aastat, mistõttu ei kaasatud teda ka *in vitro* eksperimentidesse. Ülejäänud rühmade erinevates valimit iseloomustavates tunnuste keskmistes väärtustes ei esinenud suurt lahknevust üldvalimi ja rakukultuuri katsetesse kaasatud patsientide vahel.

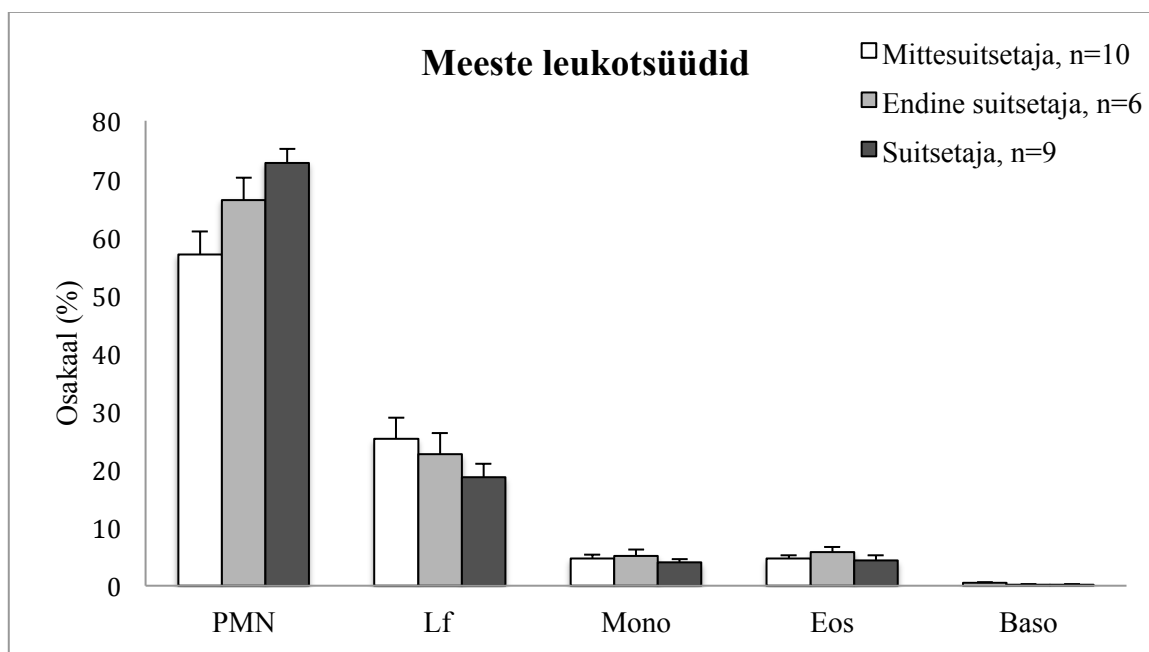
Tabel 3. ECRHS osalejate andmed. Tabeli ülemises osas on välja toodud leukotsüütide diferentsiaalloenduses osalenud uuringurühmade iseloomustus ning tabeli alumises osas rakukultuuri katsetes osalenud rühmad. Valimi iseloomustamiseks on tabelis esitatud keskmised väärtused ning sulgudes väärtuste vahemik. Vanus, suitsetamise staaž ja aeg suitsetamisest loobumisest on esitatud aastates ning suitsetamise intensiivus pakk-aastates (p-a).

Sugu	Staatus	Vanus	Staaž	Aeg loobumisest	Intensiivsus (p-a)
Mees	Mittesuitsetaja (n=10)	49,5 (41-63,5)			
	Endine suitsetaja (n=6)	55 (48,5-62)	17,5 (3-33)	20,7 (5,5-40,5)	15,7 (3-33)
	Suitsetaja (n=9)	51 (44-62)	33,9 (26-47)		30,6 (16,8-37,7)
Naine	Mittesuitsetaja (n=38)	52 (40-64)			
	Endine suitsetaja (n=17)	53,5 (42-63)	18 (2-37)	13 (3-30)	9,3 (0,4-43,5)
	Suitsetaja (n=5)	52 (47-63)	31 (20-46)		19,1 (12-29)
Mees	Mittesuitsetaja (n=5)	49 (40,5-59)			
	Endine suitsetaja (n=4)	56 (49-62)	21,5 (16-33)	17,9 (5,5-34)	20,3 (10,3-33)
	Suitsetaja (n=5)	50 (44-62)	34,6 (29-47)		29 (16,8-37,7)
Naine	Mittesuitsetaja (n=5)	52,4 (46,5-61,5)			
	Endine suitsetaja (n=5)	56 (43-63)	23,6 (11-36)	13,9 (3-30)	10,7 (7,7-14)
	Suitsetaja (n=4)	53 (41,5-63)	33 (20-46)		20 (12-29)

2.3.3 ECRHS osalejate leukotsüütide diferentsiaalloendus

Suitsetamise mõju hindamiseks inimese vererakkudele võrreldi omavahel patsientide gruppe vastavalt soole ja suitsetamisharjumustele. Selleks valmistati vereproovidest eraldatud WBC põhjal tsütospinnid, mis värviti May-Grünwald-Giemsa meetodil. Antud värving võimaldab valgusmikroskoobis visuaalselt eristada leukotsüütide alatüüpe vastavalt värvusele, tuuma kujule ning graanulite olemasolule rakkudes (LISA 1). Leukotsüütide diferentsiaalloendus viidi läbi 85 ECRHS III uuringus osalenud patsiendi vererakkude põhjal, kelle hulka kuulus 25 meest ja 60 naist.

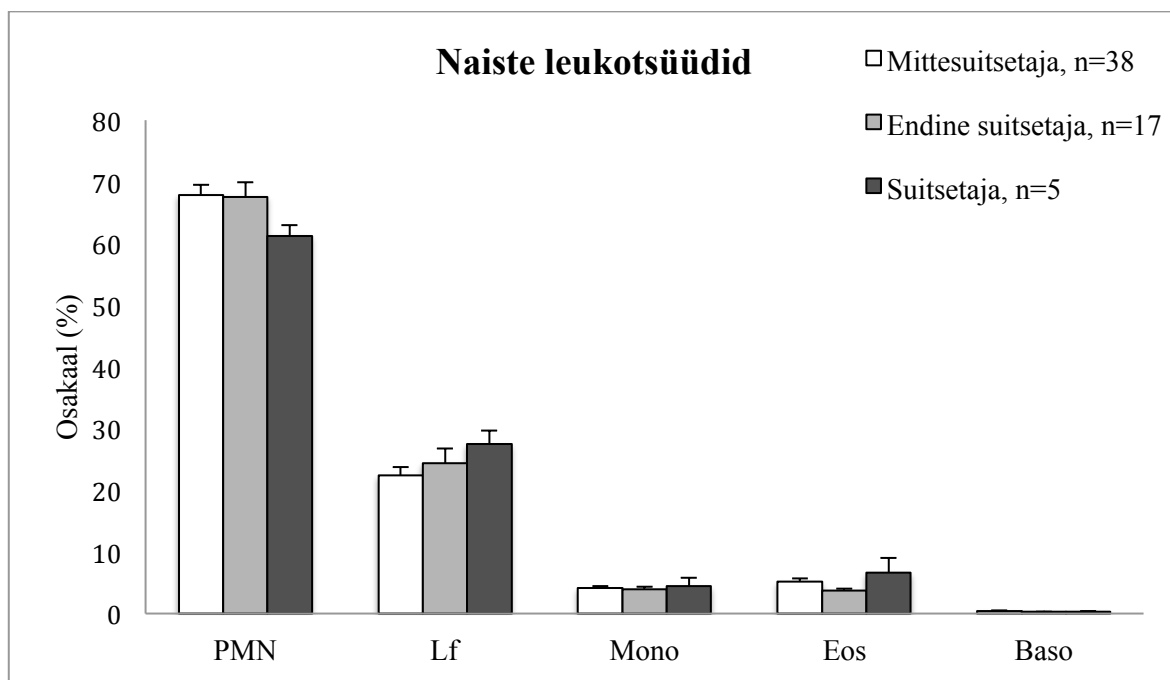
Meeste vererakkude diferentsiaalloenduse tulemustes ei esinenud küll statistiliselt olulisusi erinevusi mittesuitsetajate leukotsüütide alampopulatsioonides võrreldes endiste ja praeguste suitsetajatega, kuid ilmneseid siiski teatud muutused rakupopulatsioonide osakaaludes. Leukotsüütide võrdluses on näha seoseid suitsetamisharjumuse ning neutrofiilide ja lümfotsüütide hulga muutustes (joonis 5). Loenduse andmetest selgus, et suitsetamisega kokkupuutunud patsientidel on neutrofiilide hulk veres suurenenud. Seejuures on näha ka trend, et mida rohkem on inimene puutunud elu jooksul kokku suitsetamisega seda suurem on neutrofiilide osakaal veres. Mittesuitsetajatel oli keskmiselt neutrofiilide osakaal vere rakulises koostises 57%, endistel suitsetajatel 66% suitsetajatel oli neutrofiilide osakaal tõusnud 16% võrra, ulatudes 73%-ni. Lümfotsüütide korral esines vastupidine tendents. Mittesuitsetajate veres on lümfotsüütide osakaal 25%, mis väheneb endistel suitsetajatel 23%-ni ning veelgi enam praegustel suitsetajatel, ulatudes 19%-ni.



Joonis 5. ECRHS meeste vere leukotsüütide jaotus. Graafikul on kajastatud WBC alampopulatsioonide osakaalud protsentides mittesuitsetajate, endiste suitsetajate ja suitsetajate hulgas. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. PMN–neutrofiilid, Lf–lümfotsüüdid, Mono–monotsüüdid, Eos–eosinofiilid, Baso–basofiilid.

Uuringus osalenud naispatsientide leukotsüütide diferentsiaalloenduse tulemustest selgus, et sarnaselt meestele olid muutused samuti toimunud neutrofiilide osas. Naiste puhul ei ilmenud muutust neutrofiilide hulga suurenemises, pigem esines neutrofiilide hulga vähenemine suitsetajatel võrreldes mittesuitsetajatega. Mittesuitsetajate veres moodustasid neutrofiilid 68%,

endistel suitsetajatel 67% ning suitssetajatel 61% (joonis 6). Lisaks neutrofiilidele oli võrreldes meestega muutusi näha ka lümfotsüütide osakaalus. Mittesuitssetavatel naistel moodustasid lümfotsüüdid 22% vererakkudest, endistel suitssetajatel oli lümfotsüütide osakaal tõusnud 24%-ni ning suitssetajatel koguni 27%-ni.



Joonis 6. ECRHS naiste vere leukotsüütide jaotus. Graafikul on kajastatud WBC alampopulatsioonide osakaalud protsentides mittesuitssetajate, endiste suitssetajate ja suitssetajate hulgas. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. PMN–neutrofiilid, Lf–lümfotsüüdid, Mono–monotsüüdid, Eos–eosinofiilid, Baso–basofiilid.

Analüüsitud tulemustes ei esinenud küll statistiliselt olulisusi erinevusi mittesuitssetajate leukotsüütide alampopulatsioonides võrreldes endiste ja praeguste suitssetajatega, kuid ilmneseid siiski teatud muutused rakupopulatsioonide osakaaludes. Saadud tulemused andsid siiski alust arvata, et suitsetamine võib mõjutada leukotsüütide alampopulatsioone erinevalt ja seeläbi muuta vere rakulist koostist. Leidmaks seoseid vere rakulise koostise ja suitsetamisharjumuste vahel otsustati läbi viia rakukultuuri katsed ning uurida sigareti suitsu kondensaadi ja e-sigareti vedelike mõju leukotsüütide elulemusele ning alampopulatsioonide jaotusele suitssetajate, endiste suitssetajate ja mittesuitssetajate patsientide rühmades.

2.3.4 Rakukultuuri eksperimendid

2.3.4.1 Tsentrifuugi programmi optimeerimine

Eelkatsetest selgus, et oluline rakkude kadu tekib sulatamisjärgsel tsentrifuugimisel. Kuna ECRHS patsientidega läbiviidavates katsetes kasutatavate rakkude hulk oli limiteeritud, otsustati maksimaalse elusrakkude hulga saavutamise eesmärgil teostada tsentrifuugimise optimeerimiskatsed (tabel 5) rakkude elulemuse hindamiseks erinevatel programmidel. Tulemuste võrdlemisel selgus, et inimeste primaarsete leukotsüütide jaoks on optimaalseim fuugimisprogramm 56xg, 10 min 37°C juures, mille kiirendus ja aeglustus olid maksimaalselt aeglaseks reguleeritud. Eelmainitud programmiga saadi rakkude elulemuseks peale tsentrifuugimist 23%. Tulemustele tuginedes saab väita, et ajaliselt tagab kõrgema ellujäänud rakkude hulga lühem tsentrifuugimisaeg. Samal tsentrifugaaljõul katsetatud 15 min (6. programm) ja 20 min (7. programm) kestvusega programmide korral saadi rakkude elulemuseks vastavalt 11,5% ja 10%. Esimesena katsetatud 25xg 10 min programmi madal elulemus on tingitud ilmselt sellest, et see polnud piisava tsentrifugaaljõuga rakkude settimiseks. Seda tõestab asjaolu, et ka 5. programmiga (56xg 5 min) saadi madalam elulemusprotsent kui sama tsentrifugaaljõuga poole pikema programmi vältel. Lähtudes optimeerimiskatsete tulemustest, rakendati analüüsitava ECRHS patsientide WBC tsentrifuugimistel kõrgeimat elulemust näidanud 2. programmi.

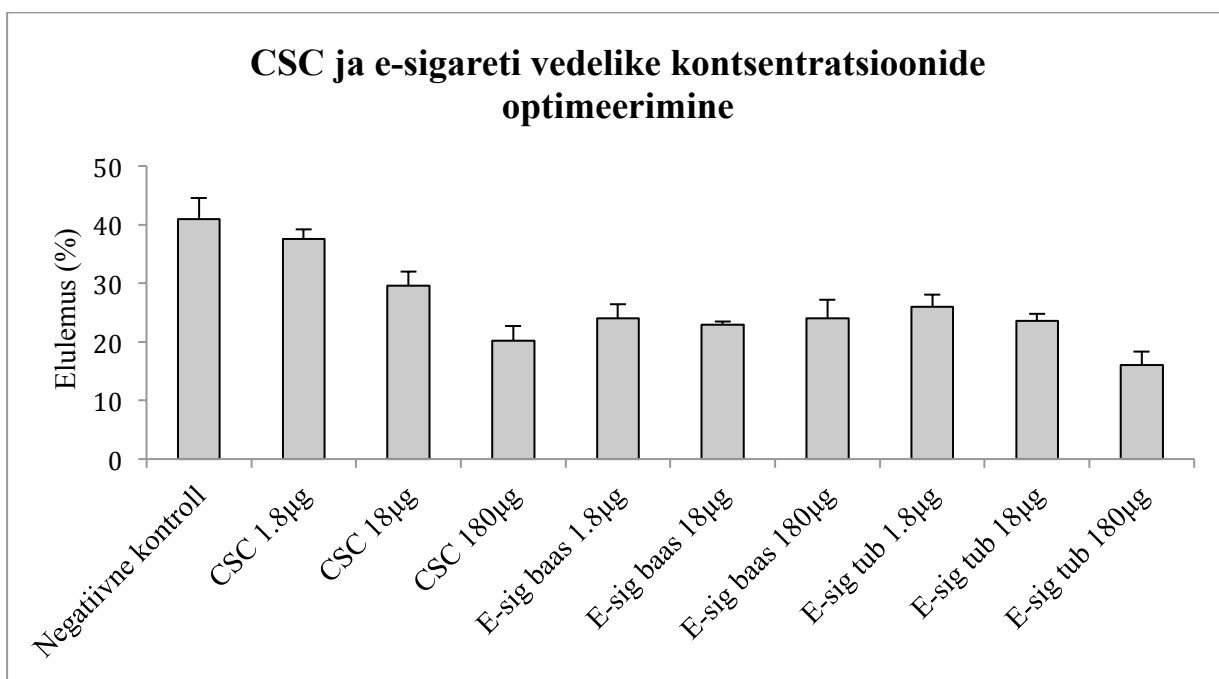
Tabel 5. Rakkude elulemus tsentrifuugi programmide optimeerimiskatsetel.

Programm	Rcf (g)	Aeg (min)	Temperatuur (°C)	Kiirendus/aeglustus	Elulemus (%)
1	25	10	37 °C	0	12
2	56	10	37 °C	0	23
3	100	10	37 °C	0	13
4	157	10	37 °C	0	12
5	56	5	37 °C	0	17,5
6	56	15	37 °C	0	11,5
7	56	20	37 °C	0	10

2.3.4.2 CSC ning e-sigareti vedelike kontsentratsioonide optimeerimine

Eksperimendis kasutatavate sigareti suitsu kondensaadi (CSC, ingl *cigarette smoke condensate*) ning e-sigareti vedelike kontsentratsioonide valimiseks viidi läbi eeleksperiment, mille käigus võrreldi kolme erineva nikotiini kontsentratsiooniga stimulantide mõju leukotsüütide elulemusele. Optimeerimiskatsed viidi läbi kolmes paralleelses korduses ning rakkude elulemuse võrdlemisel erinevatel kontsentratsioonidel lähtuti aritmeetilistest keskmistest. CSC ning e-sigareti vedelike mõju hindamiseks rakkude elulemusele valiti negatiivseks kontrolliks stimuleerimata rakud. Kuna inimese primaarsed rakud on peale sulatamist nõrgad ning paljud neist surevad rakukultuuris, siis oli ilma stimulatsioonita negatiivse kontrolli lisamine olulise tähtsusega hindamaks just CSC ning e-sigareti vedelike mõju rakkude elulemusele.

Optimeerimiskatse tulemustest on nii CSC kui ka tubakamaitselise ja maitseta e-sigareti vedelike erinevate kontsentratsioonide võrdluses näha muutusi leukotsüütide elulemuses. Stimuleerimata rakkude elulemus ulatus peale 6 h inkubatsiooni keskmiselt 41%-ni. CSC 1,8 µg/ml kontsentratsiooni korral saadi rakkude elulemuseks peale stimulatsiooni 37,5%, mistõttu ei esinenud märgatavat erinevust rakkude elulemuses võrreldes negatiivse kontrolliga (joonis 7). Samas CSC 18 µg/ml kontsentratsiooniga langes rakkude elulemus 29,5%-ni ning 180 µg/ml kontsentratsiooni korral omakorda 20%-ni. Seega oli CSC stimulatsioonide korral selgelt näha, et kontsentratsiooni taseme tõstmine põhjustas tähelepanuväärset rakkude elulemuse alanemist. Erinevalt CSC stimulatsioonidest esines juba 1,8 µg/ml tubakamaitselise e-sigareti vedelikuga erinevus rakkude elulemuses võrreldes negatiivse kontrolliga langedes 26%-ni. Kontsentratsiooni tõstmisel 10x saadi leukotsüütide elulemuseks 23,5% ning 180 µg/ml stimulatsiooni korral vähenes elulemus 16%-ni. Erinevalt eelnevatest variantidest saadi e-sigareti maitseta baasvedeliku optimeerimisel ootamatud tulemused, millest järeldus, et baasvedelikuga stimuleerimisel toimub küll nähtav elulemuse langus võrreldes negatiivse kontrolliga, kuid nikotiini erinevad kontsentratsioonid enam elulemust ei muutnud. Katsest selgus, et ka 100x nikotiini kontsentratsiooni varieeruvus maitseta baasvedeliku korral ei mõjuta üldist leukotsüütide arvu, sest kõigi kontsentratsioonidega saadi rakkude elulemuseks peale inkubatsiooni 23,5% ($\pm 0,5$).



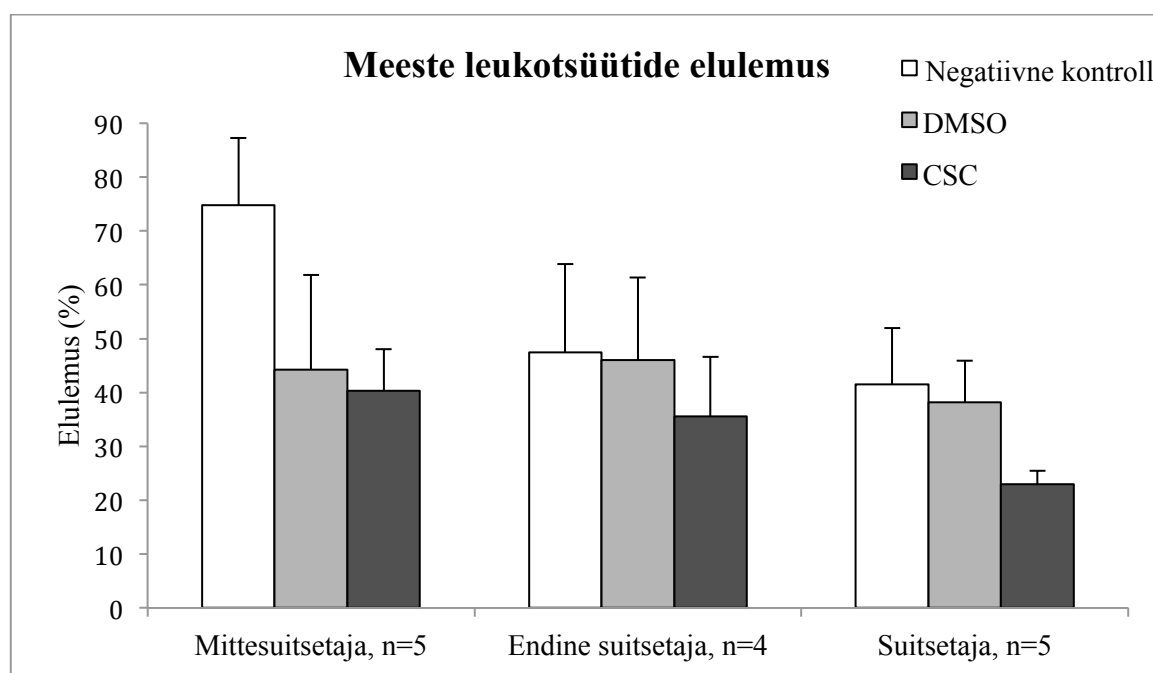
Joonis 7. CSC ja e-sigareti vedelike optimeerimiskatse tulemused. Optimeerimiskatses saadud rakkude elulemuse tulemused on esitatud keskmise väärtusena koos standardveaga. CSC – sigareti suitsu kondensaad, E-sig baas – maitseta e-sigareti baasvedelik, E-sig tub – tubakamaitseline e-sigareti vedelik. Optimeerimiskatses kasutati tubakatoodete kontsentratsioone 1,8 µg/ml, 18 µg/ml ja 180 µg/ml.

Optimeerimiskatse põhjal tuli otsutada, millise kontsentratsiooniga stimuleerida ECRHS III uuringus osalenud patsientide rakke. Otsuse langetamiseks tuli kõigepealt paika seada siht, kas katse eesmärgiks on kangeima nikotiini kontsentratsiooni kasutamine ja sellest tulenevalt ka madalaim rakkude elulemus või hoopis lahjema nikotiini kontsentratsiooni kasutamine ning kõrgeima rakkude elulemuse tulemus. Lõpliku valiku tegemisel lähtuti lisaks elulemuse hinnangule ka tsütospinnide kvaliteedist, mis tehti peale rakukultuuri stimulatsioone (peatükk 2.2.4). Kuna ECRHS patsientide põhjal läbiviidavates eksperimentides analüüsitakse leukotsüütide alampopulatsioonide elulemust ka peale CSC ning e-sigareti vedelike rakukultuuri stimulatsioone, siis osutus tulemuste tõlgendamisel oluliseks ka tsütospinnide kvaliteet. Tulenevalt tsütospinnide visuaalsest vaatlusest välistati katses kasutamiseks 180 µg/ml nikotiini kontsentratsiooniga tubakatooted, sest nendel tsütospinnidel oli diferentsiaallooduse läbiviimine raskendatud. Vastavalt tsütospinnide visuaalsele hinnangule ning erinevate nikotiini sisaldusega stimulantide mõju analüüsimisest leukotsüütide elulemusele, otsustati patsientide rakkude stimuleerimisel kasutada sigareti suitsu kondensaati ja tubakamaitselist e-sigareti vedelikku

kontsentratsiooniga 18 µg/ml. Selleks, et kõiki stimulatsioone omavahel võrrelda, kasutati sama nikotiini kontsentratsiooni ka rakkude stimuleerimisel maitseta e-sigareti baasvedelikuga.

2.3.4.3 CSC mõju leukotsüütide elulemusele

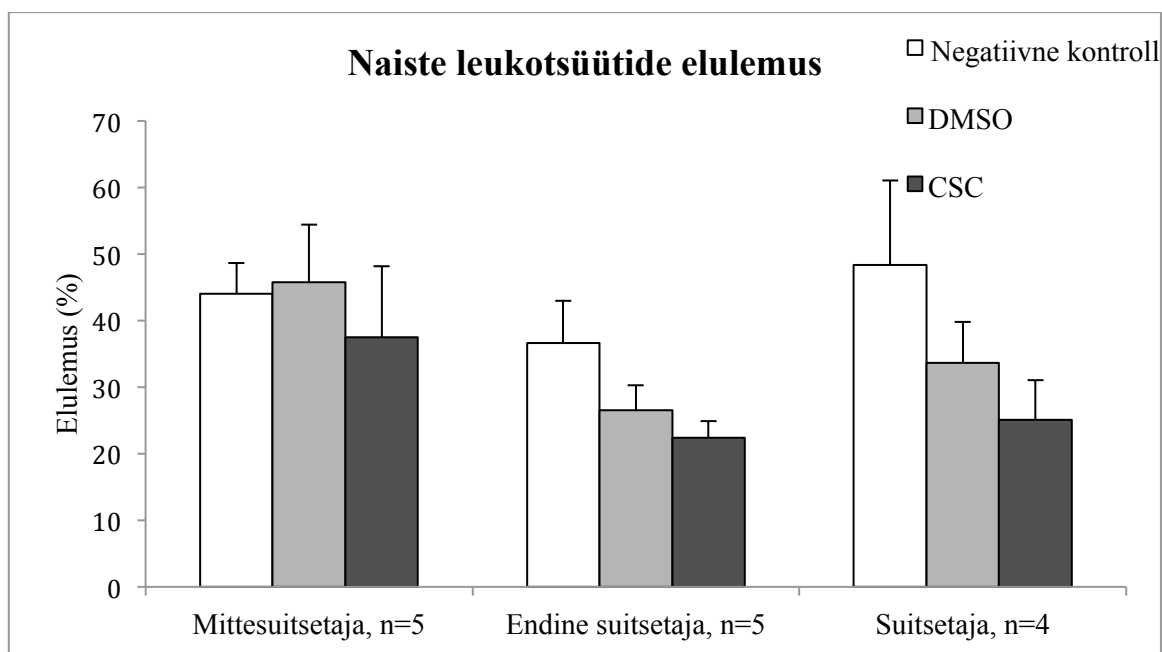
CSC mõju hindamiseks stimuleeriti ERCHS III uuringus osalenud 28 indiviidi verest eraldatud leukotsüüte rakukultuuris 6 h vältel. Eksperimendi käigus analüüsiti eraldi nii meeste kui ka naiste grupe sõltuvalt suitsetamisharjumustest. Vastavalt tootjapoolsele informatsioonile on CSC lahustatud DMSO-s, mistõttu oli CSC otsese mõju hindamiseks rakkudele vajalik kontrollina stimuleerida rakke ka lahustis endas. Leukotsüütide stimuleerimisel DMSO-ga lähtuti samast lahjendusfaktorist nagu kasutati 18 µg/ml CSC kontsentratsiooni saamiseks kultuuris.



Joonis 8. Meeste vere leukotsüütide elulemus rakukultuuri eksperimentides. Rakukultuuri katsetes uuriti eraldi CSC ja DMSO mõju meeste leukotsüütide elulemusele mittesuitsetajatel, endistel suitsetajatel ja suitsetajatel. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. n – valimi suurus

Erinevate suitsetamisharjumustega meeste leukotsüütide võrdlemisel ilmnas tendents, et mida pikaaegsem on kokkupuude suitsetamisega, seda madalam on leukotsüütide elulemus (joonis 8). Mittesuitsetavate meeste rühmas saadi leukotsüütide elulemuseks negatiivse kontrolli korral 75%, endistel suitsetajatel oli see langenud 48%-ni ning suitsetajate rühmas 42%-ni. Meeste hulgas on

näha leukotsüütide elulemuse alanemise tendentsi ka CSC stimulatsioonide korral, eelkõige suitsetajate rühmades. Mittesuitsetajatel ilmnes märgatav elulemuse alanemine ka DMSO stimulatsiooni korral, mis võimendus veelgi CSC toimet. CSC stimulatsioonidel saadi mittedsuitsetajate leukotsüütide elulemuseks 40%, endistel suitsetajatel 36% ja suitsetajatel 23%. Seega võib järeldada, et nii DMSO kui ka CSC pärsvad leukotsüütide elulemust, kuid ainult suitsetajate rühmades esinevad erinevused ka DMSO ning CSC stimulatsioonidel. Seetõttu on alust arvata, et suitsetajate leukotsüüdid on tundlikumad ning CSC vähendab nende elulemust veelgi.



Joonis 9. Naiste vere leukotsüütide elulemus rakukultuuri eksperimentides. Rakukultuuri katsetes uuriti eraldi CSC ja DMSO mõju naiste leukotsüütide elulemusele mittedsuitsetajatel, endistel suitsetajatel ja suitsetajatel. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. n – valimi suurus

Naiste leukotsüütide elulemuse hindamisel on näha teatavat leukotsüütide kõrgemat elulemust võrreldes mittedsuitsetajate rühmaga (joonis 9). Mittesuitsetajate rühmas oli leukotsüütide elulemus keskmiselt 44%, kuid suitsetajate rühmas 48%. Negatiivse kontrolli võrdlemisel DMSO stimulatsiooniga selgus, et endiste suitsetajate ja ka suitsetajate rühma kuuluvate naiste leukotsüütide elulemus langeb kokkupuutel DMSO-ga ning sigareti suitsu kondendaat võimendab seda veelgi. Kuid erinevalt suitsetajatest ei esinenud mittedsuitsetajate rühmas leukotsüütide elulemuse alanemist DMSO korral võrreldes negatiivse kontrolliga.

Mittesuitsetajatest naiste rühmas saadi leukotsüütide elulemuseks CSC stimulatsiooniga 38%, endiste suitsetajate rühmas 22% ja suitssetajate rühmas 25%. Sarnaselt meestele on ka elu jooksul suitssetamisega kokkupuutunud naiste leukotsüütide korral näha märgatavat elulemuse vähenemist DMSO ja CSC stimulatsioonide korral. Seetõttu võib arvata, et suitssetajatest naiste leukotsüüdid on samuti tundlikumad sigareti suitsu kondensaadile võrreldes mittesuitsetajate rühmaga.

Kuna rakukultuuri katsetes ei esinenud statistiliselt olulist erinevust mittesuitsetajate, endiste suitsetajate ja suitssetajate leukotsüütide elulemuses CSC stimulatsioonil, otsustati järevalt läbi viia leukotsüütide diferentsiaalloenduse eksperimendid. Kuigi üldine elulemus ei ole CSC stimulatsioonil muutunud, võivad tekkida erinevused leukotsüütide alampopulatsioonides sõltuvalt CSC mõjust spetsiifilistele rakutüüpidele.

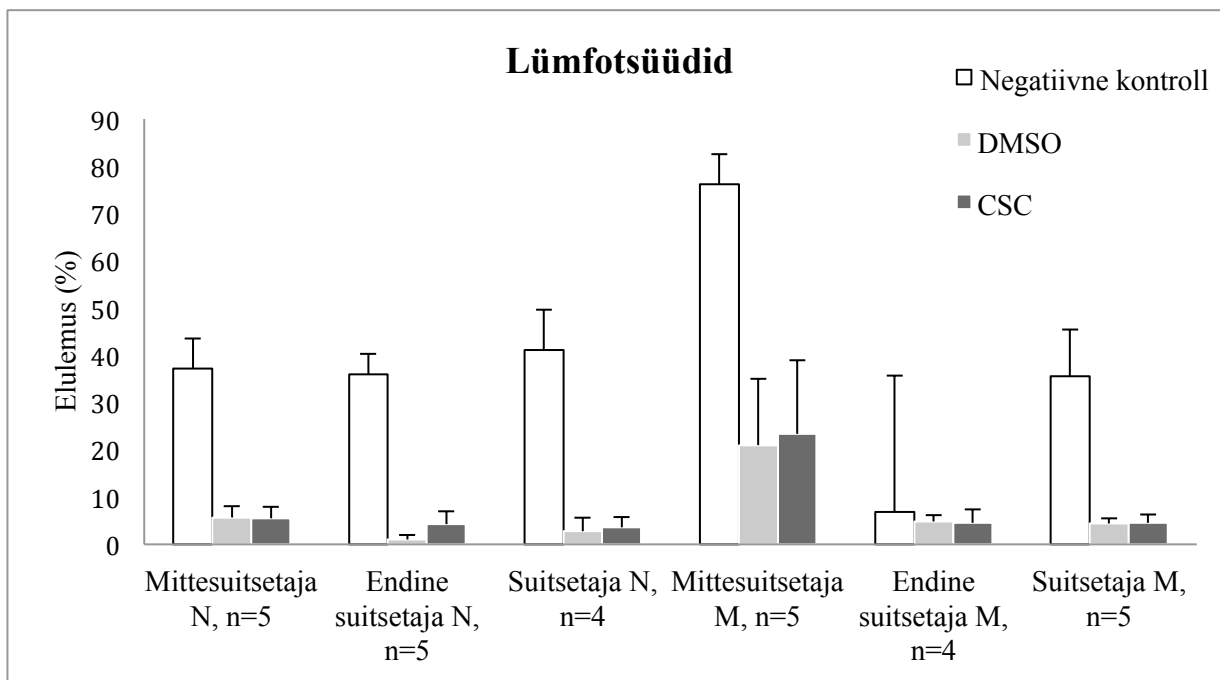
2.3.4.3.1 CSC mõju leukotsüütide alampopulatsioonidele

CSC mõju hindamiseks leukotsüütide erinevatele rakutüüpidele valmistati peale rakukultuuri katseid iga indiviidi stimulatsioonide kohta tsütospinnid ja viidi läbi leukotsüütide diferentsiaalloendus. Kuna varasemalt on teada, et krüopreservatsioon mõjutab vererakkude elulemust peale sulatamist (Fowke jt., 2000; Weinberg jt., 2000), siis tehti tulemuste usaldusväärsuse tagamiseks iga patsiendi kohta tsütospinnid ka vahetult peale sulatamisjärgset rakkude tsentrifuugimist. Antud samm võimaldas analüüsida iga patsiendi leukotsüütide alampopulatsioonide elulemusprotsendi enne rakkude istutamist. Tuginedes raku-populatsioonide osakaalule enne ja vahetult peale rakukultuuri stimulatsioone, oli tsütospinnide diferentsiaalloenduse põhjal võimalik hinnata stimulantide mõju leukotsüütide alampopulatsioonide elulemusele suitsetajatel, endistel suitsetajatel ja mittesuitsetajatel eraldi meeste ja naiste võrdluses.

2.3.4.3.1.1 CSC mõju lümfotsüütidele

Naispatsientide korral oli nii mittesuitsetajate, endiste suitsetajate kui ka suitssetajate rühmades näha sarnast tulemust. Negatiivse kontrolli korral varieerus lümfotsüütide elulemus 36-41% vahel (joonis 10). Sarnane efekt saadi ka DMSO ja CSC stimulatsioonide korral kui kõikide rühmade lümfotsüütide elulemus langes kriitiliselt madalaks. Naistest mittesuitsetajate rühmas saadi nii

DMSO kui ka CSC korral elulemuseks 5%, mistõttu ei avaldanud lümfotsüütidele täiendavat mõju enam CSC, vaid efekti omas DMSO. Sarnased tulemused saadi ka naiste suitsetajate rühmas.

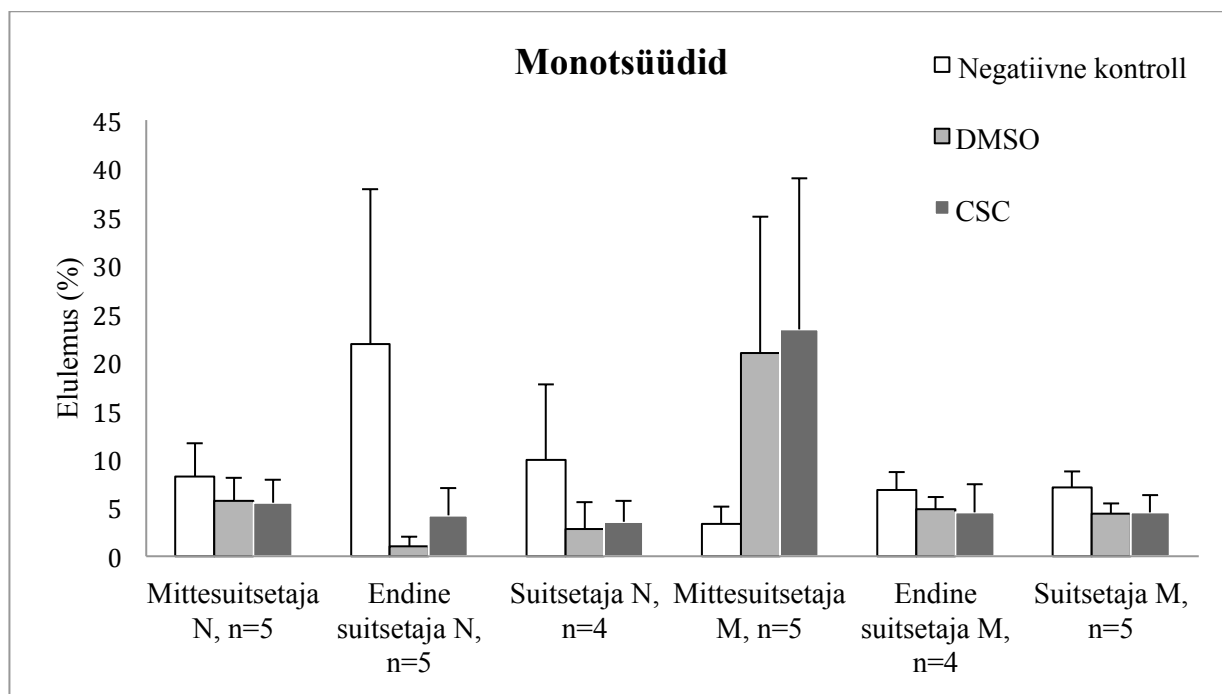


Joonis 10. CSC ja DMSO mõju lümfotsüütide elulemusele. Rakukultuuri katsetes uuriti eraldi CSC ja DMSO mõju lümfotsüütide elulemusele mittesuitsetajatel, endistel suitsetajatel ja suitsetajatel. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. N – naine, M – mees.

Seevastu meespatsientide analüüsimisel ilmnemine erinevused grupiti ka negatiivsetes kontrollides. Mittesuitsetajate lümfotsüütide elulemuseks saadi 42%, endistel suitsetajatel 76% ning suitsetajatel 36% (joonis 10). Sarnaselt naistele ilmnemine ka meeste puhul oluline lümfotsüütide elulemuse langus rakkude stimuleerimisel nii DMSO kui ka CSC-ga, kuid CSC ei omanud enam täiendavat efekti lümfotsüütide elulemusele. Mittesuitsetajate rühmas langes lümfotsüütide elulemus DMSO korral 21%-ni, endistel suitsetajatel 5%-ni ning suitsetajatel 4%-ni. Toetudes tulemustele võib väita, et mittesuitsetavate meeste lümfotsüütide osakaal on üldiselt suurem võrreldes mittesuitsetavate naiste rühmaga.

2.3.4.3.1.2 CSC mõju monotsüütidele

Naiste hulgas esinesid nii mittesuitsetajate, endiste suitsetajate kui ka suitsetajate rühmades varieeruvused monotsüütide elulemuses negatiivsete kontrollide korral. Tulemustest selgus, et mittesuitsetajate monotsüütide elulemus on 8%, endistel suitsetajatel saadi elulemuseks 22% ning suitsetajate rühmas 10% (joonis 11). Monotsüütide elulemuse hindamisel selgus, et mittesuitsetavatel naistel pärsib DMSO rakkude elulemust, kuid CSC seda enam ei muuda. Endiste suitsetajate rühmas ilmnis samuti, et DMSO stimulatsioonil väheneb leukotsüütide elulemus märgatavalt, kuid CSC seda efekti ei suurenda. Samalaadsed tulemused esinesid ka suitsetajate naispatsientide rühmas. Kuid nii endiste suitsetajate kui ka suitsetajate rühmas oli selgelt näha, et võrreldes negatiivse kontrolliga avaldavad DMSO ja CSC suuremat mõju monotsüütide elulemuse alanemisele.



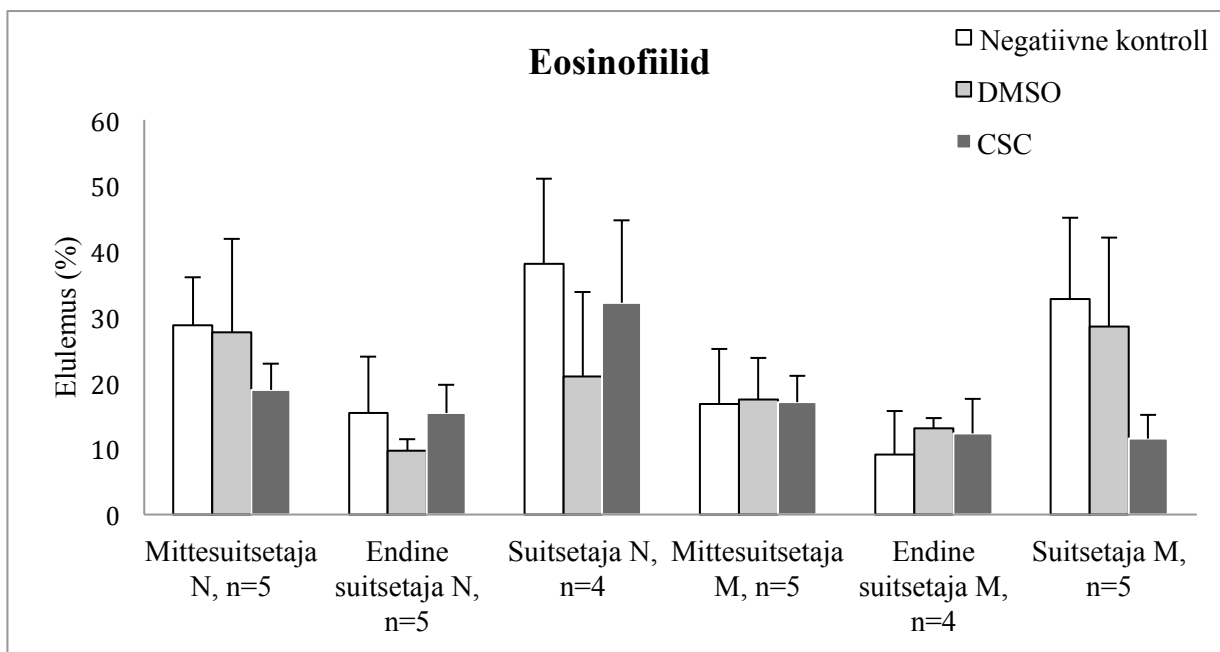
Joonis 11. CSC ja DMSO mõju monotsüütide elulemusele. Rakukultuuri katsetes uuriti eraldi CSC ja DMSO mõju monotsüütide elulemusele mittesuitsetajatel, endistel suitsetajatel ja suitsetajatel. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. N – naine, M – mees.

Sarnaselt monotsüütide elulemusele naiste korral oli ka meeste hulgas nende elulemus mittesuitsetajate rühmades madalam võrreldes suitsetamisega kokkupuutunud meeste rühmadega.

Mittesuitsetajate monotsüütide elulemuseks saadi 3%, samas endistel suitsetajatel oli monotsüütide elulemus tõusnud ligi 7%-ni ning suitsetajate rühmas 7%-ni. Mittesuitsetajatest meeste hulgas oli näha selget monotsüütide elulemuse tõusu peale DMSO ning CSC stimulatsioone, samas kui endiste ja praeguste suitsetajate hulgas alandas DMSO lisamine monotsüütide elulemust 2% võrra ning CSC ei omanud täiendavat efekti rakupopulatsiooni elulemusele.

2.3.4.3.1.3 CSC mõju eosinofiilidele

Negatiivse kontrolli korral oli näha erinevusi eosinofiilide elulemuses erinevate suitsetamisharjumustega naiste rühmades. Naistest mitesuitsetajate rühmas saadi eosinofiilide elulemuseks 29%, endiste suitsetajate rühmas 16% ning suitsetajate rühmas oli eosinofiilide elulemus tõusnud 38%-ni (joonis 12). Diferentsiaalloenduse tulemustest selgus, et erinevalt mononukleaarsetest rakkudest ei mõjunud DMSO lisamine mitesuitsetajatest naiste eosinofiilide elulemusele pärssivalt, kuid CSC stimulatsiooni korral ilmnis elulemuse alanemine 19%-ni. Seevastu saadi ootamatud tulemused naiste endiste suitsetajate rühmas, kus DMSO stimulatsioon vähendas eosinofiilide elulemust 21%-ni. Samas CSC stimulatsioon soodustas eosinofiilide elulemust.



Joonis 12. CSC ja DMSO mõju eosinofiilide elulemusele. Rakukultuuri katsetes uuriti eraldi CSC ja DMSO mõju eosinofiilide elulemusele mitesuitsetajatelt, endistelt suitsetajatelt ja

suitsetajatel pärit rakkude põhjal. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. N – naine, M – mees.

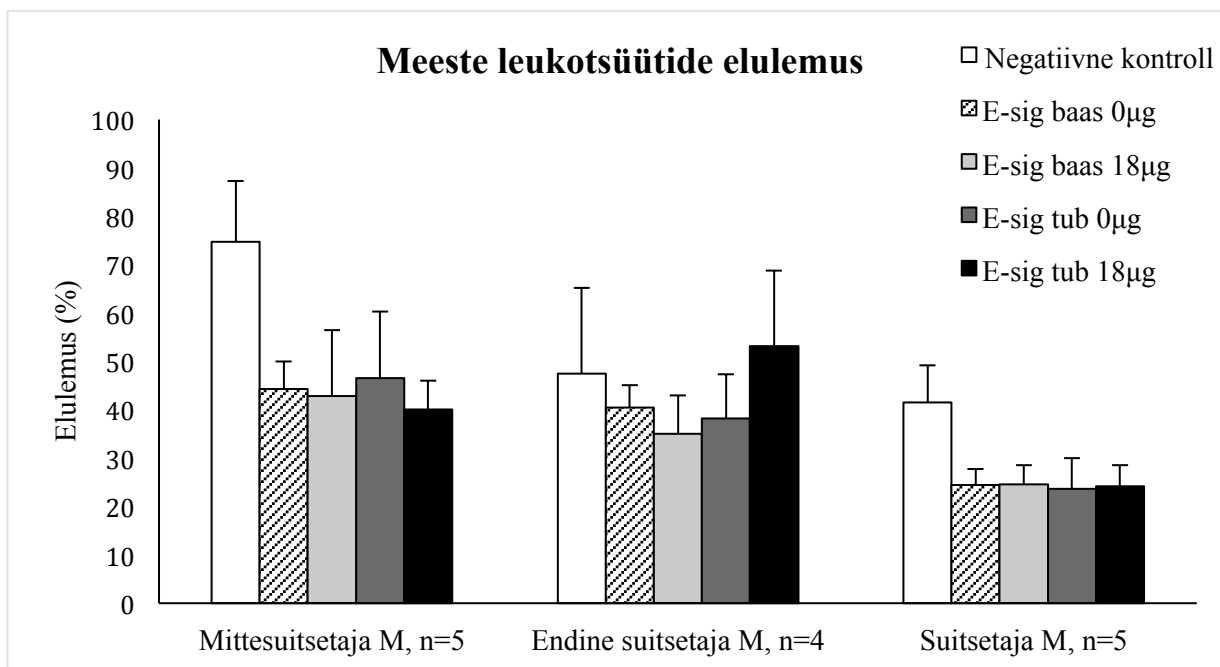
Meeste puhul oli rakukultuuris ellujäänud eosinofiilide hulk negatiivse kontrolli korral mitesuitsetajatel 17%, endistel suitsetajatel 9% ning suitsetajate rühmas koguni 33%. Sarnaselt naistele ei mõjutanud DMSO ka mitesuitsetajatest meeste eosinofiilide elulemust, seejuures ei muutnud seda ka CSC. Endiste suitsetajate grupis ilmnas väike eosinofiilide elulemuse tõus võrreldes negatiivse kontrolliga nii DMSO kui ka CSC korral. See-eest suitsetajate rühmas ilmnasid nähtavad muutused. DMSO lisamisel rakkudele alanen nende elulemus 29%-ni ning efekti võimendas veelgi CSC stimulatsioon, mille korral langes eosinofiilide elulemus suitsetajatest meeste rühmas 12%-ni. Seega ei mõjutanud CSC mitesuitsetajatest meeste eosinofiilide elulemust peale rakukultuuri stimulatsioone, kuid avaldas pärssivat mõju eosinofiilide elulemusele suitsetajate rühmas.

2.3.4.4 E-sigareti vedelike mõju leukotsüütide elulemusele

Sarnaselt CSC stimulatsioonidele hinnati ka e-sigareti vedelike mõju leukotsüütide elulemusele. Rakukultuuri eksperimentis kasutati nii ilma maiste- ja lõhnaaineteta e-sigareti baasvedelikku kui ka tubakamaitselist e-sigareti vedelikku. Mõlemad vedelikud oli nii nikotiini lisandiga kui ka ilma nikotiinita. See võimaldas uurida eraldi nii vedeliku, vedelikus sisalduvate lõhna- ja maitseainete ning ka vedelikus sisalduva nikotiini mõju leukotsüütide elulemusele. Stimulatsioonide usaldusväärseks võrdlemiseks lisati nikotiini mittedisaldavaid e-sigareti vedelikke rakukultuuri katsetesse sama lahjendusfaktoriga nagu nikotiini sisaldavaid vedelikke. E-sigareti vedeliku maitse valimisel eelistati tarbija seas ühte levinumatest - tubakamaitselist e-sigareti vedelikku.

Tulemuste analüüsimisel meeste hulgas selgus asjaolu, et leukotsüütide elulemus rakukultuuris erineb võrreldavates rühmades sõltuvalt patsientide suitsetamisharjumustest (joonis 13). Mitesuitsetajatest meeste hulgas oli stimuleerimata leukotsüütide elulemus peale rakukultuuri 75%, endiste suitsetajate rühmas oli vastav väärtus langenud 47%-ni ning suitsetajate hulgas veelgi, vähenedes 41%-ni. Tulemuste hindamisel rühmade kaupa selgus, et leukotsüütide elulemusele mõjub pärssivalt eelkõige e-sigareti vedelik, olenemata maitsest või nikotiini sisaldusest. Seevastu ilmnasid teatud erinevused endiste suitsetajate rühmas, kus e-sigareti vedeliku stimulatsioonid ei avaldanud leukotsüütidele elulemusele niivõrd otsest mõju. Ootamatu

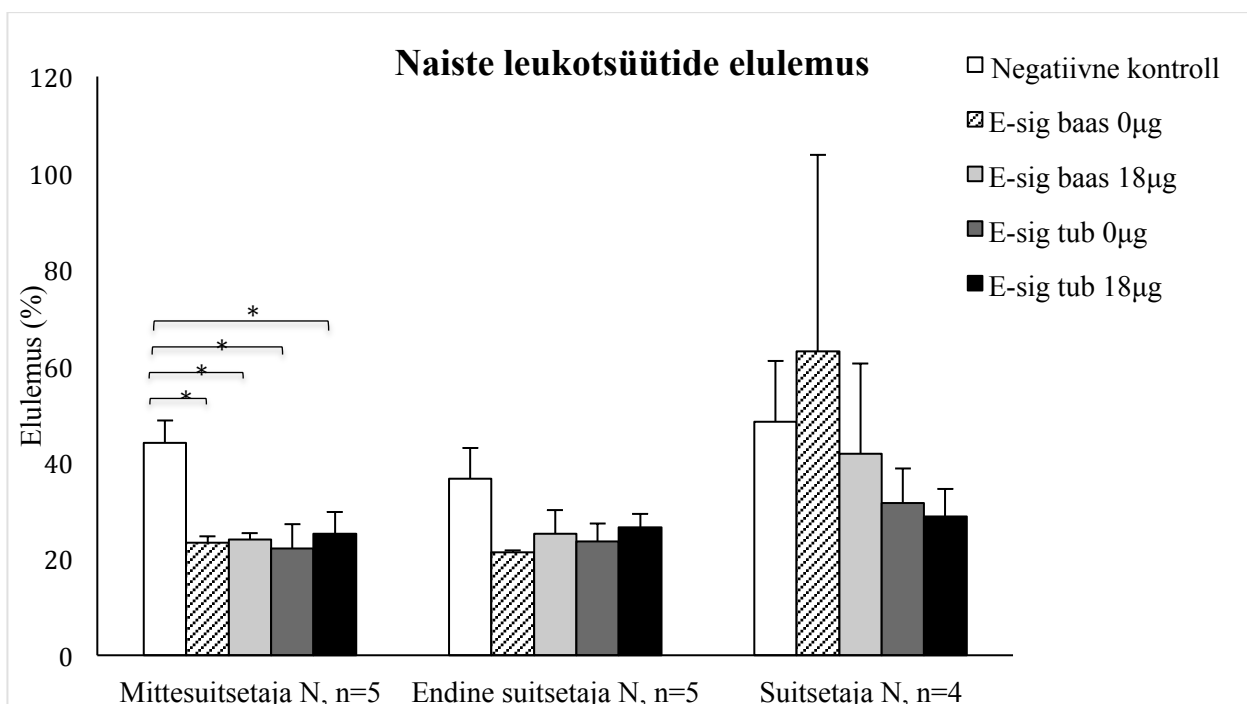
tulemus ilmnes rakkude stimuleerimisel 18 µg/ml nikotiini kontsentratsiooniga e-sigareti tubakamaistelise vedelikuga, mis ei omanud nähtavat efekti leukotsüütide elulemusele võrreldes negatiivse kontrolliga. Sarnaselt mitesuitsetajate rühmale esines ühtlane rakkude elulemuse alanemine e-sigareti vedeliku korral ka suitsetajate rühmas. Suitsetaja rühma negatiivse kontrolli korral saadi leukotsüütide elulemuseks 42% ning sõltumata e-vedeliku maitse või nikotiini sisaldusest saadi stimulatsioonide korral elulemuseks 24-25%.



Joonis 13. E-sigareti vedelike mõju meeste leukotsüütide elulemusele. Rakukultuuri katsetes uuriti eraldi nikotiini mitesisaldavate ja 18 µg/ml nikotiini sisaldavate e-sigareti tubakamaitseteliste ning maitseta baasvedelike mõju meeste leukotsüütide elulemusele mitesuitsetajatel, endistelt suitsetajatel ja suitsetajatel. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. M – mees, n – valimi suurus rühmas.

Erinevalt meestest ei ilmenud naiste hulgas nähtavat seost suitsetamisharjumuste ja leukotsüütide elulemuse vahel negatiivsetest kontrollides (joonis 14). Nii mitesuitsetajate, endiste suitsetajate kui ka suitsetajate rühmades varieerus leukotsüütide elulemus 37-48% ulatuses. Mitesuitsetajatest naiste rühmas on näha, et e-sigareti vedeliku lisamisel väheneb leukotsüütide elulemus ligi poole võrra varieerudes 22-25% vahel. Kõik antud rühma e-sigareti vedeliku stimulatsioonidel saadud elulemuse tulemused osutusid statistiliselt olulisteks võrreldes negatiivse kontrolliga. Endiste suitsetajate rühmas esinesid samalaadsed tulemused mitesuitsetajate rühmaga. E-sigareti vedelike lisamisel vähenes leukotsüütide elulemus 37%-lt

21-26%-ni. Seevastu suitsetajate rühmas esinesid teatud erinevused. Tulemustest selgus, et tubakamaitseelise e-sigareti vedeliku lisamisel rakkudele nende elulemus alaneb ning väheneb veelgi nikotiini olemasolul. Sarnane trend ilmnes ka maitseta baasvedeliku korral, mil nikotiini olemasolu mõjus leukotsüütide elulemusele pärssivalt võrreldes nikotiini mittesisaldava vedelikuga. Kuid ootamatuks osutus e-sigareti baasvedeliku mõju suitsetajatest naiste rühmale, millest ei ilmnenud negatiivset efekti leukotsüütide elulemusele. Eksperimentidest selgus, et nii meestel kui ka naistel mõjutab leukotsüütide elulemust eelkõige e-sigareti vedeliku stimulatsioon sõltumata lisatud maitse- ja lõhnaainetest või nikotiinist.



Joonis 14. E-sigareti vedelike mõju naiste leukotsüütide elulemusele. Rakukultuuri katsetes uuriti eraldi nikotiini mittesisaldavate ja 18 µg/ml nikotiini sisaldavate e-sigareti tubakamaitseeliste ning maitseta baasvedelike mõju naiste leukotsüütide elulemusele mitesuitsetajatel, endistelt suitsetajatel ja suitsetajatel. N – naine, n – valimi suurus rühmas. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. * - $P < 0.05$.

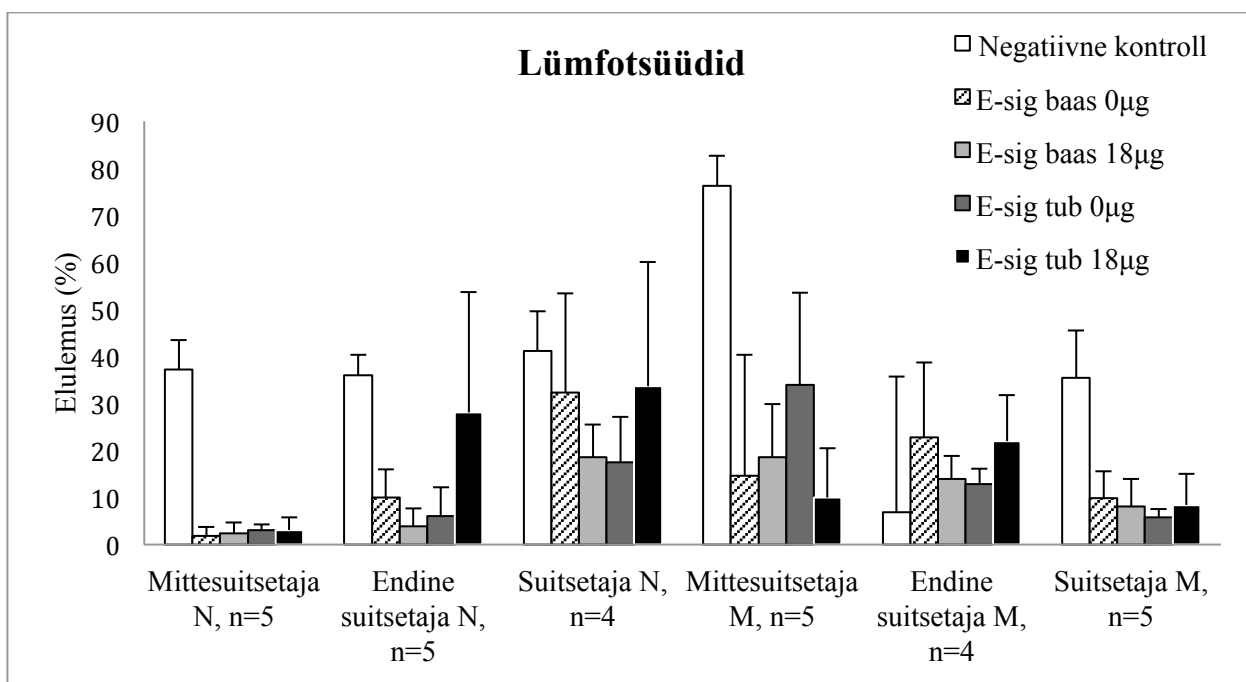
Analoogselt CSC mõju hindamisega leukotsüütide alampopulatsioonidele teostati e-sigareti vedelike mõju hindamiseks samasugune katseplaan nagu eelpool kirjeldatud (peatükk 2.3.4.3.1). Saadavad tulemused võimaldavad uurida, kas e-sigareti vedelikud muudavad spetsiifiliselt leukotsüütide alampopulatsioonide elulemust.

2.3.4.4.1 E-sigareti vedelike mõju leukotsüütide alampopulatsioonidele

2.3.4.4.1.1 E-sigareti vedelike mõju lümfotsüütidele

Naiste leukotsüütide rakukultuuri eksperimentide tulemustest ilmnes, et sõltumata nende suitsetamisharjumustest varieerus stimuleerimata lümfotsüütide elulemus peale rakukultuuri eksperimente 36-41% vahel (joonis 15) ning erinevused lümfotsüütide elulemuses tulenesid kokkupuutest e-sigareti vedelikega. Mittesuitsetajatest naiste rakkude stimuleerimisel e-sigareti vedelikega toimus märgatav lümfotsüütide elulemuse alanemine kuni 3%-ni olenemata e-sigaretile lisatud maitsest või nikotiini sisaldusest. Ka endiste suitsetajatest naiste rühmas oli näha e-sigareti vedelikust sõltuvat lümfotsüütide elulemuse alanemist. Kõige väiksemat mõju avaldasid e-sigareti vedelikud naistest suitsetajate rühma lümfotsüütide elulemusele. Nii endiste suitsetajate kui ka suitsetajate rühmas ilmnes korrapära, millest lähtuvalt alanes lümfotsüütide elulemus mõlemas rühmas kõige vähem kokkupuutel 18 µg/ml nikotiini sisaldava tubakamaitselise e-sigareti vedelikuga. Endiste suitsetajate rühmas langes antud stimulatsiooni toimele elulemus 36%-lt 28%-ni ning suitsetajate rühmas 41%-lt 34%-ni.

Erinevalt naistest varieerus meeste lümfotsüütide elulemus märgatavalt mittesuitsetajate, endiste suitsetajate ja suitsetajate rühmades. Mittesuitsetajate rühmas oli lümfotsüütide elulemus peale rakukultuuri 76%, suitsetajatel oli langenud 36%-ni ning endistel suitsetajate hulgas oli toimunud laiaulatuslik lümfotsüütide elulemuse alanemine 7%-ni (joonis 15). Nii meestest mittesuitsetajate kui ka suitsetajate rühmas oli näha selge lümfotsüütide elulemuse alanemine rakkude kokkupuutel e-sigareti vedelikega. Seejuures ilmnesid mittesuitsetajate rühmas varieeruv mõju rakkude elulemusele erinevate stimulatsioonide korral. Kõige enam alanes elulemus 18 µg/ml nikotiini sisaldava tubakamaitselise e-sigareti vedeliku korral, langedes 10%-ni. E-sigareti baasvedelikega kokkupuutel alanes lümfotsüütide elulemus 14-18%-ni, kuid kõige väiksemat mõju elulemuse langusele põhjustas nikotiinita e-sigareti baasvedelik. Seevastu suitsetajate rühmas alanes lümfotsüütide elulemus 6-10%-ni olenemata stimulatsioonist. Ootamatud tulemused saadi meestest endiste suitsetajate rühmas, milles kõikide e-sigareti vedelike stimulatsioon avaldas rakkude elulemusele pigem positiivset efekti.

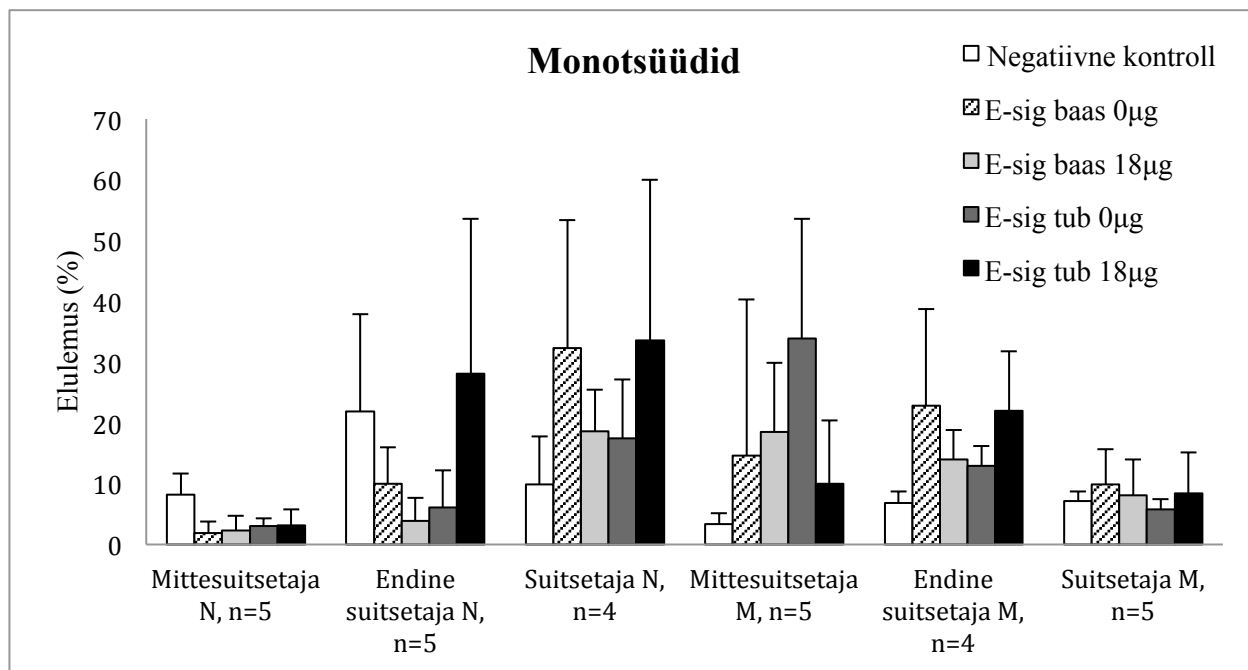


Joonis 15. E-sigareti vedelike mõju lümfotsüütidele. Rakukultuuri katsetes uuriti eraldi nikotiini mittesisaldavate ja 18 µg/ml nikotiini sisaldavate e-sigareti tubakamaitseteliste ning maitseta baasvedelike mõju lümfotsüütide elulemusele mittesuitsetajatel, endistelt suitsetajatel ja suitsetajatel. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. N – naine, M – mees.

2.3.4.4.1.2 E-sigareti vedelike mõju monotsüütidele

E-sigareti vedelike mõju hindamisel monotsüütide elulemuse ilmnemise erinevused sõltuvalt sellest, kas leukotsüüdid pärinesid mittesuitsetajate, endiste suitsetajate või suitsetajate rühmadest (joonis 16). Naistest mittesuitsetajate rühmas langes monotsüütide elulemus kokkupuutel kõigi e-sigareti vedelikega 8%-lt 2-3%-ni. Tulemustest selgus, et mittesuitsetajatest naiste korral väheneb monotsüütide elulemus eelkõige sõltuvalt kokkupuutest e-sigareti vedelikega ning selles sisalduvad tubaka lõhna- ja maitseained ega nikotiin enam täiendavat mõju ei avaldanud. Endiste suitsetajate rühmas vähendas monotsüütide elulemust enim 18 µg/ml nikotiini sisaldav e-sigareti baasvedelik, mille korral langes monotsüütide elulemus 22%-lt 4%-ni. Nikotiini mittesisaldav tubakamaitseteline ning maitseta baasvedelik avaldasid monotsüütidele võrreldes nikotiini sisaldava baasvedelikuga vähem elulemust pärssivat mõju. Ootamatu tulemus ilmnis 18 µg/ml tubakamaitsetelise e-sigareti vedeliku korral, mis avaldas monotsüütide elulemusele pigem soodsat mõju ning millega kokkupuutel tõusis monotsüütide elulemus 28%-ni. Huvitavad tulemused saadi ka suitsetajate rühmas, kus monotsüütide kokkupuutel erinevate uuringus kasutatud e-

sigareti vedelikega saadi suurem elulemus võrreldes negatiivse kontrolliga. Seejuures soodustasid monotsüütide elulemust enim nikotiinita e-sigareti baasvedelik ning nikotiini sisaldav e-sigareti tubakamaitseline vedelik, mille korral saadi elulemuseks vastavalt 32% ja 33%.



Joonis 16. E-sigareti vedelike mõju monotsüütidele. Rakukultuuri katsetes uuriti eraldi nikotiini mittesisaldavate ja 18 µg/ml nikotiini sisaldavate e-sigareti tubakamaitseliste ning maitseta baasvedelike mõju monotsüütide elulemusele mittesuitsetajatel, endistel suitsetajatel ja suitsetajatel. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. N – naine, M – mees.

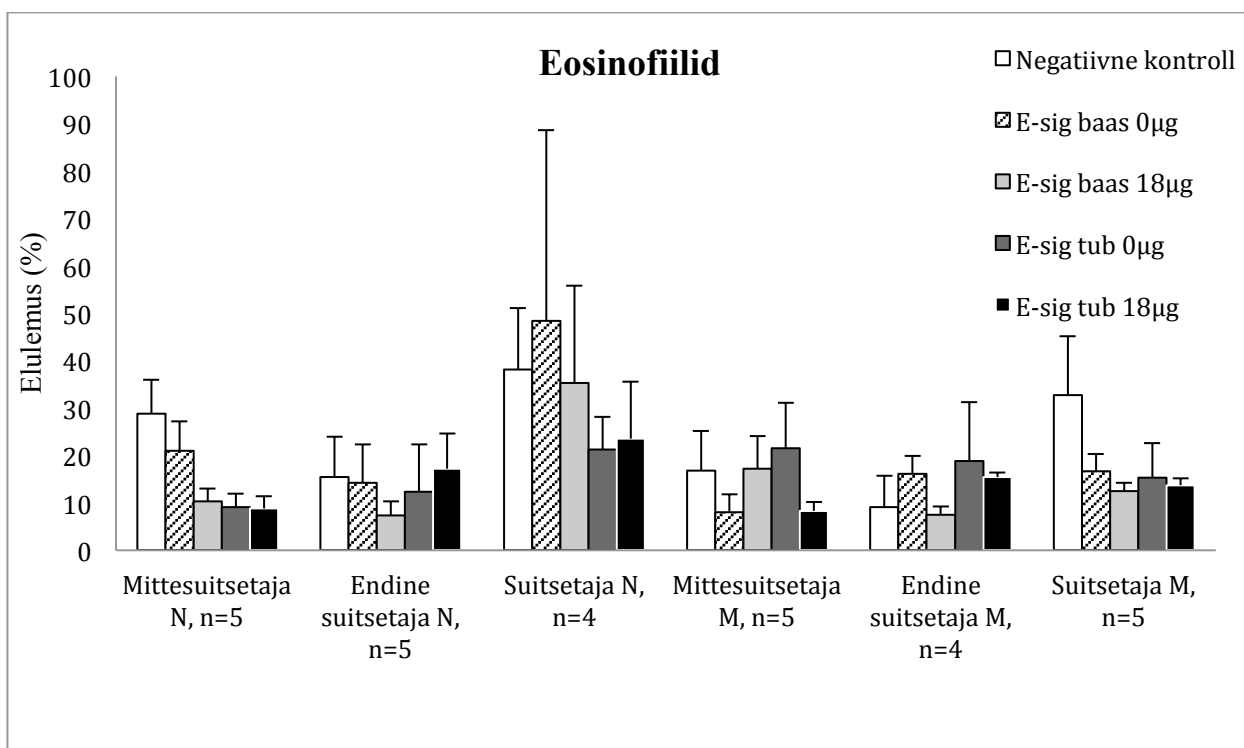
Sarnaselt naistele oli stimuleerimata rakkude korral näha sama trend ka meeste rühmades, et mittesuitsetajate korral oli monotsüütide elulemus madalam kui suitsuga kokkupuutunud meeste rakkudel. Nii mittesuitsetajate kui ka endiste suitsetajate rühmades ilmnes, et rakkude stimuleerimisel e-sigareti vedelikega jääb monotsüüte rakukultuuris rohkem ellu kui negatiivse kontrolli korral. Samas suitsetajate rühmas sellised tulemused ei esinenud. Suitsetajate rühmas varieerus nii negatiivse kontrolli kui ka erinevate stimulatsioonidega e-sigareti vedelike korral monotsüütide elulemus 6 - 8% vahel. Huvitavaks tulemuseks osutus see, et nii naistest kui ka meestest endiste suitsetajate rühmades mõjusid monotsüütide elulemusele positiivselt kõik e-sigareti vedelike stimulatsioonid. Sarnaselt naistele esines ka meeste korral suurim elulemus nikotiinita e-sigareti baasvedelike ja nikotiini sisaldava tubakamaitselise e-sigareti vedeliku korral, küündides vastavalt 23% ja 22%-ni.

2.3.4.4.1.3 E-sigareti vedelike mõju eosinofiilidele

Eosinofiilide korral ilmneseid varieeruvused elulemuses sõltuvalt sellest, kas rakud pärinesid mitteduitsetajatelt, endistelt duitsetajatelt või duitsetajatelt (joonis 17). Seejuures saadi sarnased tulemused nii naiste kui ka meeste korral. Nii naistel kui ka meestel oli eosinofiilide elulemuse negatiivse kontrolli puhul kõige kõrgem duitsetajate rühmades, ulatudes naistel 38%-ni ning meestel 33%-ni.

Naistest mitteduitsetajate rühmas ilmnese märgatav rakkude elulemuse alanemine kokkupuutel e-sigareti vedelikega. Seejuures pärssis eosinofiilide elulemust kõige vähem nikotiinita e-sigareti baasvedelik, mille korral saadi elulemuseks 21%. Ülejäänud e-sigareti vedelike korral alanes eosinofiilide elulemus 29%-lt 9-10%-ni. Endiste duitsetajate rühmas ei esinenud nii suurt elulemuse vähenemist kui mitteduitsetajatel. Märgatav efekt saadi ainult nikotiini sisaldava e-sigareti baasvedeliku stimulatsioonide korral, mille tulemusel alanes eosinofiilide elulemus 7%-ni. Seevastu duitsetajate rühmas ilmnese suurem eosinofiilide elulemuse varieeruvus erienvate stimulatsioonide korral. Tulemustest selgus, et naistest duitsetajate rühmas vähendab eosinofiilide elulemust tubakamaiteline e-sigareti vedelik ning nikotiini olemasolu enam täiendavad efekti ei lisa. Nii nikotiini sisaldava kui ka mittesisaldava tubakamaitelise e-sigareti vedeliku korral alanes eosinofiilide elulemus vastavalt 22% ja 23%-ni.

Meestest mitteduitsetajate rühmas mõjusid eosinofiilide elulemusele pärssivalt nikotiinita e-sigareti baasvedelik ja nikotiini sisaldav tubakamaiteline e-sigareti vedelik, mõlemal juhul alanes elulemus 17%-lt 8%-ni. Seevastu endiste duitsetajate rühmas ei avaldanud ükski stimualtsioon rakkudele negatiivset efekti võrreldes kontrolliga. Pigem soodustasid vähesel määral eosinofiilide elulemust nikotiini mittesisaldav e-sigareti baasvedelik ning tubakamaitelised e-sigareti vedelikud, mille puhul jällegi nikotiin enam täiendavad efekti ei andnud. Meestest duitsetajate rühmas oli kokkupuutel e-sigareti vedelikega toimunud märgatav rakkude elulemuse alanemine. Tulemustest selgus, et eosinofiilide elulemusele mõjub negatiivselt eelkõige e-sigareti vedeliku olemasolu ning täiendav tubakamaitse või nikotiin enam efekti ei mõjutanud. Duitsetajate rühmas langes e-sigareti vedelike stimulatsioonide korral eosinofiilide elulemus 33%-lt 13-17%-ni.



Joonis 17. E-sigareti vedelike mõju eosinofiilidele. Rakukultuuri katsetes uuriti eraldi nikotiini mittesisaldavate ja 18 µg/ml nikotiini sisaldavate e-sigareti tubakamaitseliste ning maitseta baasvedelike mõju eosinofiilie elulemusele mittesuitsetajatel, endistelt suitsetajatel ja suitsetajatel. Tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardveaga. N – naine, M – mees.

2.4 Arutelu

Antud uurimustöö tulemustest selgus, et 20-aastase perioodi jooksul on ECRHS uuringus osalenud inimeste hulgas toimunud suitsetajate hulga vähenemine nii meeste kui naiste seas. Uuringus osalenute leukotsüütide diferentsiaalloenduse tulemustest järeldus, et kõige enam mõjutab suitsetamine neutrofiilide osakaalu muutusi vere rakulises koostises. Järgnevalt teostatud rakukultuuri katsetest selgus, et DMSO mõjub leukotsüütide elulemusele üldiselt pärssivalt. Seejuures ilmnes DMSO kõrval täiendav CSC negatiivne mõju eelkõige suitsetajatest meeste eosinofiilidele. E-sigareti vedelikega kokkupuutel oli nii meestel kui ka naistel näha kõikides uuringurühmades leukotsüütide elulemuse alanemist, mis osutus mitesuitsetajatest naiste hulgas ka statistiliselt oluliseks. Seejuures pärssisid e-sigareti vedelikud nii meestel kui ka naistel lümfotsüütide elulemust kõikides uuringurühmades.

Suitsetamine on globaalselt levinud harjumus, mille levik on pidevas tõusutrendis. Tubakatoodete tarbimine suureneb maailmas pidevalt, millest levinuimad on klassikalised sigaretid (Yanbaeva jt., 2007). Pikaajase suitsetamisega kaasnevad muutused rakkudes, mis osadel inimestel kulmineeruvad nii kopsuhaiguste kui ka kasvaja tekkega (Conçalves jt., 2011; Lee jt., 2012). Sellest tulenevalt on nii Eesti kui ka teiste riikide sotsiaalpoliitika eesmärk teavitada inimesi üha enam tubakatoodete kahjulikkusest ja nende tarbimise tagajärjest tervisele ning elukvaliteedile. Tubakatoodete tarbimise uude võimalusena on turule tekkinud elektroonilised sigaretid, mille levik Euroopas algas peamiselt 2006. aastal (Noel jt., 2011). Neid on reklaamitud kui tervisele ohutumat alternatiivi võrreldes tavasigaretiga ning kui kergendavat meetodit suitsetamisest loobumiseks. Erinevalt teistest tubakatoodetest kehtivad e-sigarettidele Eestis kergemad määrused võrreldes üldise tubakaseadusega¹². Kuigi aja jooksul on toimunud pidev e-sigarettidele kehtivate nõuete karmistamine. Varasemalt oli seadusega olnud lubatud ka alaealistele elektrooniliste sigarettide kasutamine ja müük, kuid see keelustati Sotsiaalministeeriumi algatatud eelnõuga 2015. aastal¹³. Hetkel on Sotsiaalministeeriumi poolt algatatud uus eelnõu, millega tahetakse kehtestada Euroopa Parlamendi ja Nõukogu direktiiv 2014/40/EL, mille eesmärgiks on piirangute seadmine e-sigarettide müügile ning üldise nõuete kehtestamine Euroopa Liidus¹⁴.

¹² <https://www.riigiteataja.ee/akt/903024>

¹³ <http://sm.ee/et/uudised/martsist-ei-tohi-e-sigarette-reklaamida-ja-alaealistele-muua>

¹⁴ http://ec.europa.eu/health/tobacco/docs/dir_201440_et.pdf

ECRHS III faasis osales kokku 94 indiviidi, kellest kaasati uuringusse 85. Uuringust eemaldati 9 indiviidi, kes olid tarbinud hormoonravimeid. Varasemalt on näidatud, et hormoonravimite tarbimine põhjustab granulotsüütide hulga tõusu ja seeläbi lümfotsüütide osakaalu langust kogu WBC hulgast (Breitenfeld jt., 1978; Liles jt., 1995; Nagakawa jt., 1998; Chatham ja Kimberly, 2001). Kuna ECRHS viidi läbi kolmes faasis 20-aastase perioodi jooksul oli võimalik hinnata uuringus osalenud Tartumaa elanike suitsetamisharjumuste muutust kogu perioodi vältel. 2013. aastal läbiviidud ECRHS III faasis oli võrreldes 1993. aastal teostatud uuringu esimese faasiga näha märgatav suitsetamise vähenemine nii meeste kui ka naiste hulgas. Eesti täiskasvanud rahvastiku tervisekäitumise uuringutest on selgunud, et võrreldes 2004. aastaga oli 2014. aastaks ilmnenud märgatav igapäevasuitsetajate osakaalu vähenemine rahvastikust¹⁵. Seega on selgelt näha trendi, et valitsuse püüdlused tubakaseaduse pideva karmistamise ja aktsiiside tõstmisega on saavutamas eesmärki ning suitsetamise osakaal rahvastikus on pidevas langustendentsis. Kuna ECRHS III uuringus osalenud patsientide vanus ulatus 40-64 aastani võis vanemate patsientide suitsetamisest loobumine olla tingitud mitte ainult soovist loobuda, vaid olla ka teadlik valik tervisliku seisundi halvenemise tõttu. Siiski võiks loota, et inimeste teadlikkus suitsetamise kahjulikust mõjust tervisele on tõusnud.

Eksperimentaalses osas uuriti kõigepealt muutusi leukotsüütide alampopulatsioonide rakulises koostises mittersuitsetajate, endiste suitsetajate ja suitsetajate rühmades. Kuigi leukotsüütide diferentsiaalloenduse tulemustes ei esinenud mees- ega naispatsientide hulgas statistiliselt olulisi erinevusi mittersuitsetajate, endiste suitsetajate ja suitsetajate vere rakulises koostises, ilmnemiseid siiski teatud soost sõltuvad muutused. Meeste hulgas oli näha, et suitsuga kokkupuutel suureneb neutrofiilide osakaal, olles kõige kõrgem suitsetajate grupis. Saadud tulemused kinnitavad ka varasemad uuringud (Xu jt., 2008; Ziegler-Heitbrock jt., 2010). Neutrofiilid on immuunrakud, mille osakaal suureneb eelkõige põletiku korral, kuhu nad migreeruvad ühena esimestest rakkudest (Faurichou ja Borregaard, 2003; Kolaczowska ja Kubes, 2013) ning algatavad aktiivselt võõrvalkude elimineerimist. Nad vabastavad põletikuga seotud tsütokiine, mis võimendab veelgi põletiku protsessi ning soodustab ka teiste immuunrakkude migreerumist piirkonda. Kuna suitsetamine soodustab põletiku teket (van der Vaart jt., 2004; Lee jt., 2012),

¹⁵ https://intra.tai.ee/images/prints/documents/14274488161_T2iskasvanud_rahvastiku_tervisekaitumise_uuring_2014.pdf

suureneb suitsetajatel neutrofiilide osakaal vere rakulises koostises. Erinevalt meestest ei ilmenud naistel sarnast neutrofiilide osakaalu muutust seoses suitsetamisharjumustega. Kuna suitsetajate rühma valimi suuruseks oli naistel vaid viis patsienti, kuid meestel üheksa, siis ei pruukinud oodatavad tulemused ilmnedagi valimirühma väiksuse tõttu. Lisaks oli naiste rühma kuuluvate patsientide keskmine suitsetamise intensiivsus 20 pakk-aastat, kuid meestel oli sama näitaja 29 pakk-aastat. Varasemalt on avaldatud, et 20 pakk-aastat on kriitiliseks piiriks, millest suurema suitsetamise intensiivuse korral esineb kõikide vererakkude tõus (Jensen jt., 1998). Seega võisid erinevused vere rakulises koostises naiste ja meeste seas tuleneda suitsetamise intensiivuse suurest varieeruvusest. Järjepidev intensiivne suitsetamine võib võimendada kroonilist põletikku organismis, mille tulemusel suureneb ka neutrofiilide osakaal leukotsüütide hulgas.

Rakukultuuri katsetes CSC-ga selgus, et peamiselt mõjutab leukotsüütide elumust kõikides patsientide gruppides DMSO. DMSO stimulatsioonid tehti eraldi CSC kontrolliks, sest seda kasutati CSC lahustamiseks. Kuna DMSO mõjul vähenes rakukultuuris leukotsüütide elumus märgatavalt, võis CSC efekt elulemusele jääda maskeerituks. Võimalik, et CSC efekti saavutamiseks oleks pidanud eksperimendis kasutama suuremat kontsentratsiooni kui 18 µg/ml.

Leukotsüütide alampopulatsioonide elulemuse hindamisest DMSO ja CSC toimel selgus, et mõlemad stimulandid mõjutavad lümfotsüütide ja monotsüütide elumust sarnase mustri alusel. Nii mittersuitsetajate, endiste suitsetajate kui ka suitsetajate rühmades oli näha elulemuse vähenemist, mis oli tingitud DMSO-st ning CSC täiendavat efekti ei omanud. Seetõttu võib väita, et antud kontsentratsioonil mõjutab inimese perifeerse vere mononukleaarsetele rakkude elulemust eelkõige CSC-s sisalduv DMSO. Seevastu eosinofiilide hulgas oli näha erinevusi DMSO ning CSC stimulatsiooni korral, millest ilmnes nii rakkude elulemuse soodustav kui ka pärssiv efekt sõltuvalt sellest, kas leukotsüüdid pärinesid mittersuitsetajate, endiste suitsetajate või suitsetajate rühmadest.

CSC kui referentsigaret ei anna kindlasti otsest ülevaadet suitsetamise mõjust vererakkudele, kuid teatud järeldusi saab sellest siiski teha. Saadud tulemustest selgus, et CSC stimulatsioonide korral pärssib põhiliselt rakkude elulemuse DMSO, mis on üks peamisi CSC komponente. Seega ei ole antud katsetulemuste korral võimalik luua paralleele sigareti suitsu muude komponentide mõjuga inimese perifeerse vere leukotsüütidele. Hetkel on selgusetu, kas suitsetamine avaldab otsest mõju eosinofiilide elulemusele, kuid varasemalt on teada, et suitsetamine indutseerib

eotaksiini produktsiooni, mis on üks olulisemaid eosinofiilide migratsiooni põhjustavatest põletikulistest mediaatoritest (Yamamoto jt., 2003). Meeste seas vähenes eosinofiilide elulemus kokkupuutel CSC-ga sõltuvalt suitsetamisharjumustest. CSC omas DMSO kõrval silmnähtavat lisaefekti eosinofiilide elulemuse alanemisele suitsetajate rühmas. Kuna meeste suitsetamise intensiivsus küündis keskmiselt 29 pakk-aastani võib arvata, et järjepideva ja intensiivse suitsetamise tulemusel väheneb eosinofiilide elulemus. Seega väärib suitsetamise mõju uurimine eosinofiilide elulemusele tähelepanu ka tulevikus. Kuigi meie eksperimentides ei esinenud CSC stimulatsioonidel DMSO kõrval märgatavat efekti leukotsüütide elulemusele, on võimalik, et CSC mõjutab põletikuliste tsütokiinide produktsiooni. Selle uurimiseks tuleks järgnevalt mõõta CSC indutseeritud põletikuliste tsütokiinide produktsiooni muutust, mille ulatus ei pruukinud avaldada mõju leukotsüütide elulemusele. Antud katsetulemuste põhjal ei saa hinnata, kas CSC mõjutab kõiki granulotsüüte või omab efekti ainult eosinofiilidele. Kuna neutrofiilidele on omane väga lühike eluiga (Galli jt., 2011), siis ei olnud võimalik neid rakukultuuris analüüsida. Ka CSC mõju kohta basofiilidele ei saa teha järeldusi, sest nende arvukus veres on keskmiselt 0,5-1% (Falcone jt., 2000), mistõttu ei olnud võimalik limiteeritud rakkude koguse tõttu hinnata nende elulemust.

Paralleelselt CSC-ga teostati rakukultuuri analüüsid ka e-sigareti vedelikega. Katsetes kasutati nelja e-sigareti vedelikku: nikotiini mittesisaldavat maitseta baasvedelikku, 18 µg/ml nikotiini kontsentratsiooniga maitseta baasvedelikku, nikotiini mittesisaldavat tubakamaitselist vedelikku ning 18 µg/ml nikotiini kontsentratsiooniga tubakamaitselist vedelikku. Vedelike valikul rakukultuuri katsetesse lähtuti sellest, et oleks võimalik hinnata eraldi nii e-sigareti vedeliku mõju leukotsüütidele üldiselt, seejärel hinnata vedelikus sisalduvate lõhna- ja maitseainete ning ka nikotiini mõju leukotsüütide elulemusele. Eksperimentides kasutatava maitsevedeliku valikul lähtuti tarbijate seas ühest populaarsemast e-sigareti vedelikust, mistõttu valiti katsetesse tubakamaitselist e-sigareti vedelikud. Kuna elektrooniliste sigarettide tööpõhimõte seisneb selles, et vedelik kuumutatakse ja kondenseeritakse auruks, siis ei esine e-sigareti vedelikul otsest kontakti hingamisteede rakkudega ning ei toimu ka imendumist vereringesse. Seetõttu ei saa antud katsetulemuste põhjal leida otseseid seoseid organismis toimuvate muutusetga.

Rakukultuuri katsetest selgus, et leukotsüütide elulemust mõjutab eelkõige kokkupuude e-sigareti vedeliku endaga ning nikotiini ega maitse lisamine ei ole niivõrd seotud muutustega rakkude elulemuses. Vedelike mõju hindamisest leukotsüütide alampopulatsioonidele selgus, et kõige

tundlikumad on stimulatsioonide suhtes lümfotsüüdid. Nad on omandatud immuunse kesksed rakud, mis migreeruvad põletikukoldesse hilisemas faasis (Ryan, ja Majno, 1977; Morgan jt., 1991). Meie eksperimentides oli suhteliselt lühike, 6 tunnine inkubatsioon, mille tulemusel alanes lümfotsüütide elulemus märgatavalt. Antud asjaolu võib teoreetiliselt põhjustada lümfotsüütide arvu vähenemist. Sellest tulenevalt ei pruugi nende poolt käivitatud immuunvastus olla piisav. Seetõttu võib tekkida vigane immuunvastus võõrvalkudele, mis omakorda tingib kroonilise põletiku teket.

Eksperimendis kasutatud e-sigareti vedelikest sisaldas kõige vähem koostisosi maitseta e-sigareti baasvedelik. Vastavalt pakendi etiketile sisaldab antud toode vaid taimset glütseriini, propüleen glükooli ning destilleeritud vett. Kuigi meile ei ole teada täpne propüleen glükooli ja taimse glütseriini kontsentratsioon vedelikus, saab rakkude elulemust pärssida kas kumbki koostisosa eraldi või nende kahe kumulatiivne efekt. Taimse glütseriini mõjust immuunrakkudele ei ole publitseeritud andmeid. Seevastu on meie andmetel propüleen glükooli mõju kohta immuunrakkudele avaldatud üks publikatsioon, kus näidati, et 30 µg/ml kontsentratsioon ei avalda efekti leukotsüütide elulemusele (Draing jt., 2008).

Meie uuringutulemustest selgus, et leukotsüütide kokkupuutel taimse glütseriini ja propüleen glükooliga ilmneb märgatav rakkude suuremus. Kuna e-sigarette reklaamitakse kui tervisele ohutumalt alternatiivi suitsetamisele väärivad e-sigareti vedelike tegeliku mõju uurimine kindlasti järgnevaid eksperimente. Just naistest mittesuitsetajate rühmas esines statistiliselt oluline leukotsüütide elulemuse alanemine e-sigareti vedelike korral. Sellest tulenevalt ei tohiks e-sigarette kasutama hakata inimesed, kes pole elu jooksul varasemalt suitsetanud, sest nende mõju perifeerse vere leukotsüütidele on äärmiselt toksiline. See võib omakorda tekitada häireid immuunsüsteemi korrektses funktsioneerimises, mis soodustab mitmete põletikuga seonduvate haiguste teket. Selline e-sigareti vedelike mõju peaks olema üldsusele teada, et noored inimesed ei hakkaks kasutama e-sigaretide kui uudset ja moodsat alternatiivi suitsetamisele. Uuringust selgus ka see, et kui inimesed on elu jooksul varasemalt suitsetanud, siis ei ole e-sigareti vedelike mõju nende rakkude elulemusele niivõrd märgatav. Sellisel juhul oleks e-sigaretide kasutamine õigustatud vahendina suitsetamisest loobumiseks. On mõisteta, et antud uuringu tulemused vajavad täiendavat kinnitamist enne kui saab järeldada üldiseid soovitusi e-sigaretide kasutamise kohta. Samas on meie tulemused toonud välja hoopis uue potentsiaalselt tervisele ohtliku e-sigaretide efekti, mis kindlasti väärivad täiendavaid uuringuid.

Käesolev magistritöö on üks esimesi uuringuid primaarsete rakkude põhjal, milles vaadeldakse e-sigareti vedelike mõju inimese leukotsüütidele. Uurimustöös saadud tulemusest järeldus, et võrreldes mittesuitsetajatega on suitsetajatest meeste perifeerse vere rakulises koostises suurenenud neutrofiilide hulk, mis viitab põletikulistele protsessidele organismis. Rakukultuuri eksperimentidest selgus, et CSC ei avaldanud märgatavat mõju rakkude elulemusele, mis võis olla tingitud ülalmainitud piirangutest. Seetõttu oleks CSC mõju hindamiseks leukotsüütide elulemusele vaja kindlasti teostada lisakatseid, kasutades kõrgema CSC kontsentratsiooniga stimulatsioone. Kuna e-sigareti vedelike kokkupuude leukotsüütidega avaldas rakkude elulemusele üldiselt pärssivat mõju, mis ilmnas kõige tuntavamalt mittesuitsetajate rakkudele, siis peaks seda kindlasti edasi uurima. E-sigareti vedelike mõju täiendavaks analüüsimiseks tuleks leida võimalus viia analoogsed katsed läbi ka vedelikust kondenseeritud auruga, mis mimikeeriks paremini organismis tekkidavõivaid muutusi. Kui järgnevad eksperimendid kinnitaks meie saadud tulemusi, siis tuleks ümber lükata üldlevinud arvamused e-sigarettidest kui tervisele ohutumast alternatiivist suitsetamisele. Sel juhul tuleks ka karmistada neile kehtivaid nõudeid ning lubada nende müük ainult apteekides kui ravimina suitsetamisest loobumiseks.

KOKKUVÕTE

Suitsetamine ja sellest tingitud haigused on üheks peamiseks suremuse põhjustajaks maailmas. Pikaajaline suitsetamine põhjustab muutusi organismi kaitsevastuses, mis soodustab põletiku-liste haiguste tekkemiski. Antud uurimustöö põhineb ECRHS uuringus osalenud indiviidide vere leukotsüütidel, mis grupeeriti vastavalt soole ja suitsetamisharjumustele.

Käesoleva töö eesmärk oli hinnata suitsetamise mõju inimese perifeerse vere leukotsüütidele. Töö raames anti ülevaade suitsetamise epidemioloogiast kogu uuringu andmete põhjal. Uurimustöö eksperimentaalses osas analüüsiti erinevusi leukotsüütide rakulises koosseisus mittedsuitsetajate, endiste suitsetajate ja suitsetajate rühmades. Rakukultuuri katsetes uuriti sigareti suitsu kondensaadi ja e-sigareti vedelike mõju leukotsüütide elulemusele.

ECRHS uuringus osalenud indiviidide suitsetamisharjumustest selgus, et 20 aastase perioodi vältel on nii meeste kui ka naiste seas suitsetajate osakaal olnud pidevas langustrendis. Leukotsüütide diferentsiaalloenduse tulemustest selgus, et suitsetamine põhjustab enim muutusi neutrofiilide osakaalus meestel. Rakukultuuri eksperimentidest selgus, et CSC avaldas negatiivset mõju eelkõige suitsetajatest meeste eosinofiilidele. Leukotsüütide stimuleerimisel e-sigareti vedelikega selgus, et märgatavat rakkude elulemuse vähenemist põhjustab e-sigareti vedelik ise ning nikotiin ja tubakamaitse ei oma täiendavat efekti rakkude elulemuse vähenemisele.

Antud uurimustöö tulemustest väärib oluliseimat tähelepanu e-sigareti vedelike negatiivne efekt leukotsüütide elulemusele, mis naistest mittedsuitsetajate rühmas põhjustas statistiliselt olulist leukotsüütide elulemuse langust. Saadud tulemused annavad aluse järgnevate uuringute jaoks, milles peaks keskenduma eelkõige suitsetamise mõju uurimisele eosinofiilidele ning tuleks teostada ka täiendavad uuringud e-sigareti vedelikest kondenseeritud auru mõju uurimiseks leukotsüütide elulemusele.

Smoking-Induced Changes in Human Peripheral Blood Leukocytes

Carolín Falten

SUMMARY

Smoking affects multiple organs and increases the risk of inflammatory diseases. Therefore tobacco smoking is considered as one of the greatest contributors to premature death worldwide.

This study was conducted using blood samples and data obtained in the frame of European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). ECRHS is widespread research project encompassing 25 European countries. ECRHS includes three separate phases, which were carried out over a 20 years' period of time (1993, 2001 and 2013).

The aim of the present study was to analyze and characterize smoking induced changes in human peripheral blood leukocytes in never, ex and current smokers' groups. First task of this study was to evaluate epidemiological changes in smoking during recent 20 years. Secondly, we analyzed smoking induced changes in leukocyte subpopulations. Then, we evaluated the directed effects of cigarette smoke condensate and electronic cigarette liquids on the survival of human peripheral blood leukocytes.

We found that there is a continuous decrease in smokers' proportion over the recent decades. From experimental data we also found that in male smokers' the relative number of neutrophils was increased. *In vitro* experiments results showed that CSC has a negative effect on male smokers' eosinophiles. *In vitro* stimulations with e-cigarette liquids showed remarkable decrease in blood leukocyte viability. Moreover, the most harmful effect on leukocyte viability was in the female never smokers' group.

Further studies with more participants are needed in order to confirm our results, particularly those regarding the role of eosinophils in smoking-induced disorders and those which suggest that e-cigarette liquids reduce the viability of blood leukocytes.

TÄNUSÕNAD

Käesolev magistritöö on valminud tänu kolleegide, perekonna ja sõprade suurele toele ja abile. Suurt tänu väärivad minu kaks juhendajat. Olen väga tänulik Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi Siirdeimmunoloogia grupi juhile Svetlana Sergejevale, kes usaldas minu hoolde niivõrd olulise ja päevakajalise teema uurimise. Tänan, et andsid mulle piisavalt võimalusi ja otsustusõigust enda projekti katselise osa koostamisel. Olen tänulik kõigi laboris peetud vägagi inspireerivate ja harivate arutelude eest. Tänan, et aitasid säilitada positiivset meelt ka esialgsete negatiivsete tulemuste kogunemisel, mille käigus suunasid ja õpetasid mind analüüsima nende tekkepõhjuseid ning sellest lähtuvalt tegema vajalikke korrektuure katsete õnnestumiseks. Olen väga tänulik ka selle eest, et võimaldasid mul osaleda äärmiselt harival rahvusvahelisel teadustööde konverentsil.

Suured tänusõnad kuuluvad ka juhendaja Berit Pilden-Sarvile, kes usaldas minu kätte osa enda suuremast projektist. Tänan sind väga abi eest töö eksperimentaalse osa koostamisel ning erinevate katsetoodikate õppimisel. Tänu sinu algatatud laboratoorsele tööle oli minul olemas algmaterjal antud magistritöö eksperimentaalse osa läbiviimiseks. Tänan sind ka igakülgse abi eest lõputöö parandamisel ja selle valmimisele kaasaaitamisel. Olen väga tänulik ka kõikide laboris peetud ühiste nii teaduslike ja inspireerivate kui ka lõbusate vestluste eest.

Tänan südamest ka oma perekonda, kes on võimaldanud mul keskenduda murevabalt õpingutele ning mind igati toetanud. Tänan väga ka Sten Karrot ja Kadi Lõhmussaart igakülgse toe ning abivalmiduse eest ning Anastassia Lenskajat meeldiva seltskonna ja abistamise eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

Acharya K.R., Ackerman S.J. (2014). Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem.* **289**: 17406-15.

Adams M.R., Jessup W., Celermajer D.S. (1997). Cigarette Smoking Is Associated With Increased Human Monocyte Adhesion to Endothelial Cells: Reversibility With Oral L-Arginine but Not Vitamin C. *J Am Coll Cardiol.* **29**: 491-7.

Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 782-801.

Amulic B., Cazalet C., Hayes G.L., Metzler K.D., Zychlinsky A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**: 459–489.

Ancuta P., Rao R., Moses A., Mehle A., Shaw S.K., Luscinskas F.W., Gabuzda D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes. *J Exp Med.* **197**: 1701-1707.

Arnson Y., Shoenfeld Y., Amital H. (2010). Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun.* **34**: J258-265.

Bahl V., Lin S., Xu N., Davis B., Wang Y.H., Talbot P. (2012). Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. *Reprod Toxicol.* **34**: 529-37.

Bernhard D, Rossmann A., Wick G. (2005). Metals in cigarette smoke. *Life* **57**: 805-809.

Bluhm A.L., Weinstein J., Sousa J.A (1971). Free radicals intobacco smoke. *Nature* **229**: 500.

Boyman O., Letourneau S., Krieg C., Sprent J. (2009). Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. *European Journal of Immunology.* **39**: 2088-94.

Breitenfield R.V., Pachucki Lary.C., Hebert L.A., Piering W.F., Lemann J. Jr. (1978). Effect of Glucocorticoids on WBC Counts in Splenectomized Renal Transplant Recipients. *Arch Intern Med.* **138**: 583-585.

Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**:1532-1535.

Chatham W.W., Kimberly R.P. (2001). Treatment of lupus with corticosteroids. *Lupus.* **10**: 140-7.

- Chiba M., Masironi R. (1992). Toxic and trace elements in tobacco and tobacco smoke. *Bull World Health Organ.* **70**: 269-75.
- Coussens L.M., Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* **420**: 860-7.
- Cros J., Cagnard N., Woollard K., Patey N., Zhang S.Y., Senechal B., Puel A., Biswas S.K., Moshous D., Picard C., Jais J.P., D°Cruz D., Casanova J.L., Trouillet C., Geissmann F. (2010). Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* **33**: 375-386.
- Crotty S., Ahmed R. (2004). Immunological memory in humans. *Seminars in Immunology* **16**: 197–203.
- Dale D.C., Boxer L., Liles W.C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* **112**: 935-945.
- Deshmane S.L., Kremlev S., Amini S., Sawaya B.E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res.* **29**: 313–326.
- Ding Y.S, Zhang L., Jain R.B., Jain N., Wang R.Y., Ashley D.L., Watson C.H. (2008). Levels of tobacco-specific nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from different tobacco varieties. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **17**: 3366-71.
- Domachowske J.B., Dyer K.D., Bonville C.A., Rosenberg H.F. (1998). Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* **177**: 1458–1464.
- Doulatov S., Notta F., Laurenti E., Dick J.E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* **10**: 120-36.
- Draing C., Traub S., Deininger S., Mang P., Möller H.M., Manso M., Rossi F., Morath S., Hartung T., von Aulock S. (2008). Polypropylene glycol is a selective binding inhibitor for LTA and other structurally related TLR2 agonists. *Eur. J. Immunol.* **38**: 797–808.
- Ekberg-Jansson A., Andersson B., Avrå E., Nilsson O., Löfdahl C.G. (2000). The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and never-smoking men, 60 years old. *Respir Med.* **94**: 264-72.
- Falcone F.H., Haas H., Gibbs B.F. (2000). The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* **96**: 4028-4038.

- Faurschou M., Borregaard N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**:1317-27.
- Fernandez E.J., Lolis E. (2002). Structure, function and inhibition of chemokines. *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.* **42**: 469-99.
- Floreani A.A., Rennard S.I. (1999). The role of cigarette smoke in the pathogenesis of asthma and as a trigger for acute symptoms. *Curr Opin Pulm Med.* **5**: 38-46.
- Fowke K.R., Behnke J., Hanson C., Shea K., Cosentino L.M. (2000). Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods.* **244**: 139-44.
- Fulkerson P.C., Rothenberg M.E. (2013). Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery* **12**: 117-129.
- Galli S., Borregaard N., Wynn T.A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunol.* **12**: 1035–1044.
- Geissmann F., Jung S., Littman D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* **19**: 71-82.
- Glader P., Möller S., Lilja J., Wieslander E., Löfdahl C.G., von Wachenfeldt K. (2006). Cigarette smoke extract modulates respiratory defence mechanisms through effects on T-cells and airway epithelial cells. *Respir Med.* **100**: 818-27.
- Gleich G.J., Frigas E., Loegering D.A., Wassom D.L., Steinmuller D. (1979). Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J. Immunol.* **123**: 2925–2927.
- Gleich G.J. (2000). Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J of Allergy and Clinical Immunology* **105**: 651-663.
- Gonçalves R.B., Coletta R.D., Silvério K.G., Benevides L., Casati M.Z., da Silva J.S., Nociti F.H. Jr. (2011). Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res.* **60**: 409-24.
- Gracia M.C. (2005). Exposure to nicotine is probably a major cause of inflammatory diseases among non-smokers. *Medical Hypothesis* **65**: 253-258
- Hardy R.R. (2006). B-1 B cell development. *Journal of Immunology.* **176**: 2749-2754.

Hashimoto S., Nagai S., Sese J., Suzuki T., Obata A., Sato T., Toyoda N., Dong H., Kurachi M., Nagahata T., Shizuno K., Morishita S., Matsushima K. (2003). Gene expression profile in human leukocytes. *Blood* **101**: 3509 – 3513.

Hockertz S., Emmendörffer A., Scherer G., Ruppert T., Daube H., Tricker A.R., Adlkofer F. (1994). Acute effects of smoking and high experimental exposure to environmental tobacco smoke (ETS) on the immune system. *Cell Biol Toxicol.* **10**: 177-90.

Hodge-Dufour J., Marino M.W., Horton M.R., Jungbluth A., Burdick M.D., Strieter R.M., Noble P.W., Hunter C.A., Puré E. (1998). Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 13806-11.

Hogan S.P., Rosenberg H.F., Moqbel R., Phipps S., Foster P.S., Lacy P., Kay A.B., Rothenberg M.E. (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy.* **38**: 709-50.

Ingersoll M.A., Platt A.M., Potteaux S., Randolph G.J. (2011). Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.* **32**: 470–477.

Jacobsen E.A., Helmers R.A., Lee J.J., Lee N.A. (2012). The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood* **120**: 3882-3890.

Jaffer U., Wade R.G., Gourlay T. (2010). Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* **2**: 161–175.

Jensen E.J., Pedersen B., Fredriksen R., Dahl R. (1998). Prospective study on the effect of smoking and nicotine substitutions on leucocytes blood counts and relation between blood leucocytes and lung function. *Throax* **53**: 784-789.

Kolaczowska E., Kubes P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* **13**: 159-175.

Koyasu S., Moro K. (2012). Role of innate lymphocytes in infection and inflammation. *Front Immunol.* **3**:101.

Krause D.S. (2002). Regulation of hematopoietic stem cell fate. *Oncogene* **21**: 3262-3269.

Lee J., Taneja V., Vassallo R. (2012). Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res.* **91**:142-149.

Ley K. (2001). Pathways and Bottlenecks in the Web of Inflammatory Adhesion Molecules and Chemoattractants. *Immunologic Research* **1**:87–95.

- Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I., Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Rev. Immunol.* **7**: 678–689.
- Liles W.C., Dale D.C., Klebanoff S.J. (1995). Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood*. **86**: 3181-8.
- Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Rev. Immunol.* **11**: 519–531.
- Maskrey B.H., Megson I.L., Whitfield P.D., Rossi A.G. (2011). Mechanisms of Resolution of Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **31**: 1001-6.
- Medzhitov R., Janeway C. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med.* **343**: 338-344.
- Mehta H., Nazzal K., Sadikot R.T. (2008). Cigarette smoking and innate immunity. *Inflamm res.* **57**: 497-503.
- Morgan J.G., Pereira H.A., Sukiennicki T., Spitznagel J.K., Larrick J.W. (1991). Human neutrophil granule cationic protein CAP37 is a specific macrophage chemotaxin that shares homology with inflammatory proteinases. *Adv Exp Med Biol.* **305**: 89-96.
- Morrison D., Rahman I., Lannan S., MacNee W. (1999). Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* **159**: 473-9.
- Muller W.A. (2002). Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Lab Invest.* **82**: 521–533.
- Murakami M., Hirano T. (2012). The molecular mechanisms of chronic inflammation development. *Front Immunol.* **3**: 323.
- Nagakawa M., Terashima T., D'yachkova Y., Bondy G.P., Hogg J.C., van Eeden S.F. (1988). Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. *Circulation.* **98**: 2307-13.
- Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* **420**: 846-852.
- Ng M., Freeman M.K., Fleming T.D., Robinson M., Dwyer-Lindgren L., Thomson B., Wollum A., Sanman E., Wulf S., Lopez A.D., Murray C.J.L., Gakidou E. (2014). Smoking Prevalence and Cigarette Consumption in 187 Countries, 1980-2012. *JAMA* **311**: 183-192.

- Noel J.K., Rees V.W., Connolly G.N. (2011). Electronic cigarettes: a new 'tobacco' industry? *Tob Control* **20**: 81.
- Olson T.S., Ley K. (2002). Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. **283**: R7–R28.
- Parkin J., Cohen B. (2010). An overview of the immune system. *Lancet* **357**:1777–89.
- Phillipson M., Kubes P. (2011). The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Med.* **17**: 1381–1390.
- Pillay J., den Braber I., Vrisekoop N., Kwast L.M., de Boer R.J., Borghans J.A., Tesselaar K., Koenderman L. (2010). *In vivo* labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **116**: 625–627.
- Pisinger C., Døssing M. (2014). A systematic review of health effects of electronic cigarettes. *Prev Med.* 69: 248-260.
- Prignot J. (1987). Quantification and chemical markers of tobacco-exposure. *Eur J Respir Dis* **70**:1-7.
- Pärna K., Rahu K., Rahu M. (2002) Patterns of smoking in Estonia. *Addiction* 97:871–876. -
- Pääkö P., Kokkonen P., Anttila S., Kalliomäki P.L. (1989). Cadmium and chromium as markers of smoking in human lung tissue. *Environmental Research.* **49**: 197–207.
- Ryan G.B., Majno G. (1977). Acute inflammation. A review. *Am J Pathol.* **86**: 183–276.
- Sadik C.D., Kim N.D., Luster A.D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* **32**: 452–460.
- Saetta M., Di Stefano A., Turato G., Facchini F.M., Corbino L., Mapp C.E., Maestrelli P., Ciaccia A., Fabbri L.M. (1998). CD8⁺ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* **157**: 822-6.
- Sarvothaman S., Undi R.B., Pasupuleti S.R., Gutti U., Gutti R.K. (2015). Apoptosis: role in myeloid cell development. *Blood Res.* **50**: 73-9.
- Schaberg T., Theilacker C., Nitschke O.T., Lode H. (1997). Lymphocyte Subsets in Peripheral Blood and Smoking Habits. *Lung* **175**: 387–394.

Schauer D., Starlinger P., Zajc P., Alidzanovic L., Maier T., Buchberger E., Pop L., Gruenberger B., Gruenberger T. (2014). Monocytes with angiogenic potential are selectively induced by liver resection and accumulate near the site of liver regeneration. *BMC Immunology* **15**:50.

Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. **1813**:878-88

Schwartz C., Eberle J.U., Voehringer D. (2016). Basophils in inflammation. *European Journal of Pharmacology* **778**: 90–95.

Sopori M. (2002). Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol*. **2**: 372-377.

Stone K.D., Prussin C., Metcalfe D.D. (2010). IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *Journal Allergy Clin Immunol*. **125**: S73-S80.

Zawada A.M., Rogacev K.S., Rotter B., Winter P., Marell R.R., Fliser D., Heine G.H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. **118**: e50-e61.

Zevin S., Saunders S., Gourlay S.G. Jacob III P., Benowitz N.L. (2001). Cardiovascular effects of carbon monoxide and cigarette smoking. *J of the American College of Cardiology* **38**: 1633-1638.

Zhang J-M., An J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin*. **45**: 27-37.

Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. **116**: e74-80.

Tai P.C., Hayes D.J., Clark J.B., Spry C.J. (1982). Toxic effects of human eosinophil products on isolated rat heart cells *in vitro*. *Biochem. J*. **204**: 75–80.

Tavian M., Biasch K., Sinka L., Vallet J., Péault B. (2010). Embryonic origin of human hematopoiesis. *Int J Dev Biol*. **54**: 1061-5.

van der Vaart H., Postma D.S., Timens W., Ten Hacken N.H.T. (2004). Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* **59**: 713-721.

Walters M.J., Paul-Clark M.J., McMaster S.K., Ito K., Adcock I.M., Mitchell J.A. (2005). Cigarette smoke activates human monocytes by an oxidant-AP-1 signaling pathway: implications for steroid resistance. *Mol Pharmacol*. **68**: 1343-53.

- Warr M.R., Pietras E.M., Passegue E. (2011). Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* **3**: 681-701.
- Wedemeyer J., Tsai M., Galli S. (2000). Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Current Opinion in Immunology* **12**: 624–631.
- Weinberg A., Zhang L., Brown D., Erice A., Polsky B., Hirsch M.S., Owens S., Lamb K. (2000). Viability and functional activity of cryopreserved mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* **7**: 714-6.
- Willershausen I., Wolf T., Weyer V., Sader R., Ghanaati S., Willershausen B. (2014). Influence of E-smoking liquids on human periodontal ligament fibroblasts. *Head Face Med.* **15**; 10:39.
- Winkel P., Statland B.E. (1981). The acute effect of cigarette smoking on the concentrations of blood leukocyte types in healthy young women. *Am J Clin Pathol.* **75**: 781-5.
- Wood D.M., Mould M.G., Ong S.B.Y., Baker E.H. (2005). “Pack year” smoking histories: what about patients who use loose tobacco? *Tob Control* **14**:141-142.
- Yanbaeva D.G., Dentener M.A., Creutzberg E.C., Wesseling G., Wouters E.F. (2007). Systemic effects of smoking. *Chest* **131**: 1557-1566.
- Yang D., Chertov O., Bykovskaia S.N., Chen Q., Buffo M.J., Shogan J., Anderson M., Schröder J.M., Wang J.M., Howard O.M., Oppenheim J.J. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**: 525-8.
- Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X-F., Wang H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* **2**: 1.
- Yasaka T., Mantich N.M., Boxer L.A., Baehner R.L. (1981). Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets. *J Immunol.* **127**: 1515-1518.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

www.echrh.org

(vaadatud 24.05.2016)

http://www.tai.ee/et/terviseandmed/uuringud?limit=0&filter_catid=0&filter_year=0&filter_pubid=0&filter_languageid=0&filter=rahvastiku%20tervisekaitumise%20uuring&filter_order=p.publis_h_year&filter_order_Dir=DESC

(vaadatud 24.05.2016)

https://intra.tai.ee//images/prints/documents/132039837321_Eesti_taiskasvanud_rahvastiku_tervi_sekaitumise_uuring_EST_ENG.pdf

(vaadatud 24.05.2016)

https://intra.tai.ee//images/prints/documents/13206646576_Eesti_taiskasvanud_rahvastiku_tervis_ekaitumine_uuring_2006_EST_ENG.pdf

(vaadatud 24.05.2016)

https://intra.tai.ee//images/prints/documents/132083925468_Eesti_taiskasvanud_rahvastiku_tervi_sekaitumise_uuring_EST_ENG.pdf

(vaadatud 24.05.2016)

https://intra.tai.ee//images/prints/documents/132091796870_Eesti_taiskasvanud_rahvastiku_tervi_sekaitumise_uuring_EST_ENG.pdf

(vaadatud 24.05.2016)

https://intra.tai.ee//images/prints/documents/136479842690_TKU_2012.pdf

(vaadatud 24.05.2016)

https://intra.tai.ee//images/prints/documents/14274488161_T2iskasvanud_rahvastiku_tervisekaitumise_uuring_2014.pdf

(vaadatud 24.05.2016)

<https://www.riigiteataja.ee/akt/903024>

(vaadatud 24.05.2016)

http://ec.europa.eu/health/tobacco/docs/dir_201440_et.pdf

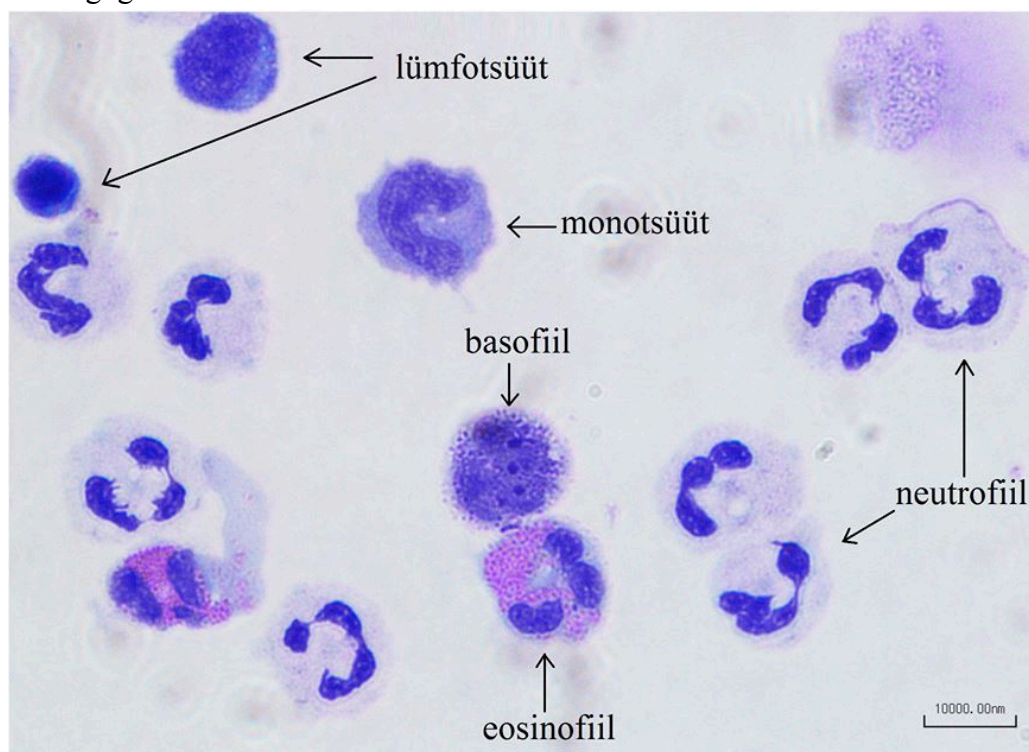
(vaadatud 24.05.2016)

<http://sm.ee/et/uudised/martsist-ei-tohi-e-sigarette-reklaamida-ja-alaealistele-muua>

(vaadatud 24.05.2016)

LISAD

LISA 1. ECRHS III uuringus osalenud mehe leukotsüütide alampopulatsioonid May-Grünwald-Giemsa värvinguga.



LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina Carolin Falten

(sünnikuupäev: 22.12.1990)

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose “Suitsetamise mõju inimese perifeerse vere leukotsüütidele”, mille juhendajad on Svetlana Sergejeva (MD, PhD) ja Berit Pilden-Sarv (MSc),
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016